

# **Inervação Simpática e Mecanismos Adrenérgicos Locais na Regulação Funcional da Córnea**

**LUÍS FIGUEIRA**

TESE DE DOUTORAMENTO APRESENTADA  
À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM 2018

MEDICINA



Luís Pedro Caldas Figueira

**Inervação simpática e mecanismos adrenérgicos locais na  
regulação funcional da córnea**



Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Medicina, apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade do Porto

Porto - 2018



Luís Pedro Caldas Figueira

**Inervação simpática e mecanismos adrenérgicos locais na  
regulação funcional da córnea**

**Orientador:** Professor Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva

**Co-Orientador:** Professor Doutor Fernando Manuel Mendes Falcão Reis



Esta investigação foi realizada, ao abrigo do Programa Doutoral em Medicina, no Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e no serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar de S. João, sob a orientação inicial do Professor Doutor Daniel Moura e subsequentemente do Professor Doutor Patrício Soares da Silva, e co-orientação do Professor Doutor Fernando Falcão Reis.

O candidato declara que teve uma contribuição determinante na realização do trabalho, interpretação dos resultados e discussão dos mesmos. Além disso contribuiu activamente para a redacção dos trabalhos apresentados.

Artigo 48º, parágrafo 3º: “A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação” (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto 19 337, de 29 de Janeiro de 1931).





CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO  
PORTO  
PROFESSORES EFECTIVOS

Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira

Doutor José Agostinho Marques Lopes

Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares Silva

Doutor Alberto Manuel Barros Da Silva

Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros

Doutora Maria Fátima Machado Henriques Carneiro

Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos

Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira

Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira

Doutor Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira

Doutor Manuel Jesus Falcão Pestana Vasconcelos

Doutor João Francisco Montenegro Andrade Lima Bernardes

Doutora Maria Leonor Martins Soares David

Doutor Rui Manuel Lopes Nunes

Doutor José Eduardo Torres Eckenroth Guimarães

Doutor Francisco Fernando Rocha Gonçalves

Doutor José Manuel Pereira Dias de Castro Lopes

Doutor António Albino Coelho Marques Abrantes Teixeira

Doutor Joaquim Adelino Correia Ferreira Leite Moreira

Doutora Raquel Ângela Silva Soares Lino

Doutor Rui Manuel Bento de Almeida Coelho



CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO  
PORTO  
PROFESSORES JUBILADOS OU APOSENTADOS

Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto  
Doutor Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar  
Doutor António Augusto Lopes Vaz  
Doutor António Carlos de Freitas Ribeiro Saraiva  
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra  
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga  
Doutor António José Pacheco Palha  
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira  
Doutor Belmiro dos Santos Patrício  
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis  
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão  
Doutor Cassiano Pena de Abreu e Lima  
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira  
Doutor Fernando Tavarela Veloso  
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Menezes  
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares  
Doutor José Carlos Neves da Cunha Areias  
Doutor José Carvalho de Oliveira  
Doutor José Fernando Barros Castro Correia  
Doutor José Luís Medina Vieira  
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães  
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra  
Doutor Luís Alberto Martins Gomes de Almeida  
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões  
Doutor Manuel António Caleira Pais Clemente  
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira  
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes  
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa  
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães  
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo  
Doutor Ovídio António Pereira da Costa  
Doutor Rui Manuel Almeida Mota Cardoso

Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães

Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso

Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

**Nomeação do Júri da Prova de Doutoramento de**

**- LUÍS PEDRO CALDAS FIGUEIRA -**

**Programa Doutoral em *Medicina***

Nos termos do disposto do n.º 2 do art.º 18.º do Regulamento dos Terceiros Ciclos de Estudos da Universidade do Porto, a seguir se publicita o júri de doutoramento em Medicina, do licenciado **Luís Pedro Caldas Figueira**, nomeado por despacho vice-reitoral de 15 de junho de 2018, com a tese “Inervação simpática e mecanismos adrenérgicos locais na regulação funcional da córnea”:

**PRESIDENTE:** Doutor José Agostinho Marques Lopes, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

**VOGAIS:** Doutor Joaquim Carlos Neto Murta, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;

Doutor Paulo Jorge da Silva Correia de Sá, professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto;

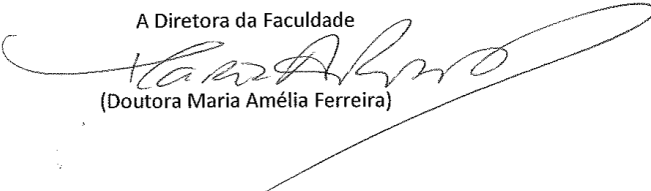
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e orientador da tese;

Doutor Carlos Alberto Matinho Marques Neves, professor auxiliar convidado da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa;

Doutor António Francisco Rosa Gomes Ambrósio, Investigador Principal da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Serviço Académico, 2 de julho de 2018.

A Diretora da Faculdade

  
(Doutora Maria Amélia Ferreira)



Ao meu pai, Pedro

À minha mãe, Maria do Carmo

Ao meu irmão, Diogo





E a ti, Catarina

E ao nosso filho, Pedro



Obrigado por tudo, Professor Daniel Moura



## AGRADECIMENTOS

A condução e execução do trabalho de investigação que agora se cristaliza em forma de tese acompanhou, e de certa forma espelhou, alguns dos maiores desafios pessoais e profissionais da minha vida.

Na sua génese e força vital pulsa, hoje e sempre, o entusiasmo contagiante do Professor Daniel Moura, meu padrinho de curso e primeiro orientador. Agradeço ao médico e humanista que me ensinou, ainda estudante de Medicina, a nortear a minha vida numa dedicação inexcedível e balanceada às necessidades daqueles que sirvo – os doentes na prática clínica, e os alunos na Faculdade de Medicina – sem negligenciar nunca o meu próprio crescimento interior.

Agradeço ao Professor Patrício Soares da Silva a disponibilidade inexcedível para acolher a orientação do meu trabalho em fase de veras adiantada, o ânimo constante bem como a criação de todas as condições para a prossecução bem sucedida deste projecto.

Agradeço ao Professor Fernando Falcão dos Reis o voto de confiança reiterado enquanto co-orientador, o incentivo e a disponibilidade criteriosa e atenta ao andamento dos trabalhos.

Agradeço ao Professor Amândio Rocha Sousa, à Professora Maria Augusta Vieira Coelho, ao Professor Fernando Magro e ao Professor Manuel Falcão os conselhos, a inspiração e a sabedoria de quem trilhou magistralmente o caminho conducente a um doutoramento. Mais do que colegas, são hoje verdadeiramente amigos.

Agradeço ao Dr. Luís Torrão, amigo desde a primeira hora, todos os pacientes conselhos e a atitude corajosa e bem disposta com que me ensinou a encarar a profissão que escolhemos. Agradeço ao Dr. Jorge Breda a confiança cedo depositada e o exemplo de rectidão e frontalidade, sem descurar nunca um humor atento e esclarecido.

Agradeço ao Dr. Jorge Palmares, ao Dr. António Santos Dinis, ao Dr. João Paulo Macedo e ao Dr. José Manuel Pestana Ferreira os ensinamentos e o exemplo de brio ético e profissional pelo qual ainda hoje tento nortear a minha actuação.

Agradeço ao Professor Paulo Torres a inspiração e o entusiasmo que, bem lá no início, me fariam escolher ser oftalmologista. Ainda antes da especialidade, o meu percurso enquanto docente foi sempre beber aos exemplos de excelência da Professora Otília Cruz, do Professor António Albino Teixeira, do Professor Serafim Guimarães, do Professor António Sarmento, do Professor João Bernardes, do Professor Manuel Vaz da Silva, do Professor Filipe Macedo, da Professora Iva Brito, do Professor Carlos Vaz e do Professor Tiago Guimarães.

Agradeço ao Dr. Carlos Pavésio a amizade, o sentido de excelência e a centelha de arrebatamento com que incinerou o meu percurso na área específica da Imunopatologia Ocular.

Agradeço a todos os co-autores do trabalho laboratorial e da produção literária – sem a vossa dedicação ou o vosso juízo crítico, este desígnio não teria sido possível. Assim, os meus sentidos agradecimentos à Professora Mónica Moreira Rodrigues, à Dra. Catarina Janeiro, à Dra. Carla Ferreira, ao Dr. João Beato, à Dra. Fátima Ferreirinha, ao Professor Paulo Correia de Sá, à Professora Margarida Duarte Araújo, ao Professor Armando Lemos, ao Dr. Nuno Gonçalves, ao Dr. Raúl Moreira, à Dra. Dolores Pinheiro, à Dra. Elisabete Pinto, à Dra. Joana Simões, à Dra. Elisa Camisa, à Dra. Sara Perestrelo, à Dra. Maria Espinar, à Dra. Yuliana Eremina, à Dra. Manuela Ribeiro e à Dra. Joana Matos.

Um agradecimento especial à Engenheira Paula Serrão e à Engenheira Joana Afonso pelo apoio e vigilância incansáveis das condições metodológicas e rigor científico nas sessões laboratoriais – se os nossos resultados atingiram significância, a elas tal facto é devido.

Queridos pai e mãe, obrigado pelo amor, compreensão e apoio incondicionais – devo-vos tudo e tudo vos dedico!

Querido irmão, meu primeiro e mais antigo amigo, obrigado por me ensinares os valores da partilha e por acreditares sempre em mim!

Querida família e queridos amigos (vocês sabem quem são, e incluo a família “adoptiva”), obrigado pela aceitação e sobretudo pelo encorajamento!

Querida Catarina e querido Pedro, agradeço-vos a honra de constituir convosco uma nova família: por vós sigo em frente, pois encontrei enfim o propósito mais perene da vida, o mais ambicioso e nobre de todos!

Em paralelo ao calcorrear de um trajecto, já de si frequentemente sinuoso, relacionado com o presente trabalho, palmilhei vitórias e derrotas pessoais, exultei e sofri, caí e reergui-me. Sedimentei o meu percurso profissional granjeando o respeito dos meus pares. Acrescentei uma segunda especialidade médica, Farmacologia Clínica, ao meu entusiasmo pela Oftalmologia.

Explorei novas paragens e civilizações. Descobri o meu lugar no singelo ordenamento das coisas neste globo terrestre. Alimentei o meu gosto pessoal pela música, literatura e arte. Demandeí novos interesses. Descobri amigos. Encontrei a minha pessoa favorita. Fui pai.

E o Professor Daniel Moura partiu.

Ao abrigo do Artigo 8º do Decreto-Lei n.º 388/70, são parte integrante desta dissertação as seguintes publicações:

- Ferreira, C.S., Figueira, L., Moreira-Gonçalves, N., Moreira, R., Torrão, L., Falcão-Reis, F., 2016. Clinical and Microbiological Profile of Bacterial Microbial Keratitis in a Portuguese Tertiary Referral Center—Where Are We in 2015? *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 0, 1. doi:10.1097/ICL.0000000000000298
- Figueira, L., Pinheiro, D., Moreira, R., Pinto, E., Simões, J., Camisa, E., Torrão, L., Palmares, J., Falcão-Reis, F., 2012. *Beauveria bassiana* keratitis in bullous keratopathy: Antifungal sensitivity testing and management. *Eur. J. Ophthalmol.* 22, 814–818.
- Beato, J., Espinar, M., Figueira, L., Eremina, Y., Ribeiro, M., Moreira, R., Falcão-Reis, F., 2016. *Elizabethkingia meningoseptica* and Contact Lens Use. *Acta Med. Port.* 29, 287.
- Figueira, L., Matos, J., Serrao, P., Falcao-Reis, F., Moura, D., 2012a. Concentration gradient of endogenous noradrenaline from periphery to centre in the rabbit cornea. *Acta Ophthalmol.* 90, 1–6 (Special Issue: Abstracts from the 2012 European Association for Vision and Eye Research Conference).
- Figueira, L., Ferreira, C., Janeiro, C., Serrao, P., Falcao-Reis, F., Moura, D., 2018. Concentration gradient of noradrenaline from the periphery to the centre of the cornea - A clue to its origin. *Exp. Eye Res.* doi:10.1016/j.exer.2018.01.008
- Figueira, L., Janeiro, C., Ferreirinha, F., Serrao, P., Perestrelo, S., Falcao-Reis, F., Correia-de-Sa, P., Moura, D., 2018. Regulation of corneal noradrenaline release and topography of sympathetic innervation: functional implications for adrenergic mechanisms in the human cornea. *Exp Eye Res.* doi: 10.1016/j.exer.2018.05.023.





## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>21</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>27</b>
<b>II. ABSTRACT</b>	<b>31</b>
<b>III. INTRODUÇÃO</b>	<b>35</b>
SOBRE A CÓRNEA	35
SOBRE A INERVAÇÃO DA CÓRNEA	43
SOBRE A INERVAÇÃO SIMPÁTICA E OS ADRENOCEPTORES DA CÓRNEA	50
SOBRE A QUERATOPATIA NEUOTRÓFICA E A INFECÇÃO DA CÓRNEA	52
OBJECTIVOS	53
<b>IV. PUBLICAÇÕES</b>	<b>55</b>
<b>CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL PROFILE OF BACTERIAL MICROBIAL KERATITIS IN A PORTUGUESE TERTIARY REFERRAL CENTER—WHERE ARE WE IN 2015?</b>	<b>57</b>
<b>BEAUVERIA BASSIANA KERATITIS IN BULLOUS KERATOPATHY: ANTIFUNGAL SENSITIVITY TESTING AND MANAGEMENT</b>	<b>65</b>
<b>ELIZABETHKINGIA MENINGOSEPTICA AND CONTACT LENS USE</b>	<b>73</b>
<b>CONCENTRATION GRADIENT OF ENDOGENOUS NORADRENALINE FROM PERIPHERY TO CENTRE IN THE RABBIT CORNEA</b>	<b>79</b>
<b>CONCENTRATION GRADIENT OF NORADRENALINE FROM THE PERIPHERY TO THE CENTRE OF THE CORNEA - A CLUE TO ITS ORIGIN</b>	<b>87</b>
<b>REGULATION OF CORNEAL NORADRENALINE RELEASE AND TOPOGRAPHY OF SYMPATHETIC INNERVATION: FUNCTIONAL IMPLICATIONS FOR ADRENERGIC MECHANISMS IN THE HUMAN CORNEA</b>	<b>97</b>
<b>V. DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>111</b>
CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PRINCIPAIS FACTORES DE RISCO LOCAIS E SISTÉMICOS PARA INFECÇÃO DA CÓRNEA, COM DESTAQUE PARA AQUELES ASSOCIADOS A PERTURBAÇÃO DA INERVAÇÃO CORNEANA	111
CRIAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE CÓRNEA EM ANIMAL DE EXPERIÊNCIA (COELHO), COM ADEQUADA REPRODUTIBILIDADE NO HOMEM, PARA ESTUDO DOS MECANISMOS ADRENÉRGICOS E DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA	114
DETERMINAÇÃO DA PRINCIPAL ORIGEM DA NORADRENALINA (NEURONIAL OU NÃO-NEURONIAL) NA CÓRNEA DE COELHO E NA CÓRNEA HUMANA	114
CARACTERIZAÇÃO DA REGULAÇÃO PRÉ-JUNCIONAL DA LIBERTAÇÃO DE NORADRENALINA NA CÓRNEA, NOMEADAMENTE A PRESENÇA E ACTIVIDADE DOS ADRENOCEPTORES ALFA-2 PRÉ-SINÁPTICOS	121
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA NA CÓRNEA E DEFINIÇÃO DA SUA RELEVÂNCIA FUNCIONAL	126
ESTABELECIMENTO DA IMPORTÂNCIA RELATIVA DAS CONTRIBUIÇÕES DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO E DOS MECANISMOS ADRENÉRGICOS LOCAIS NA CÓRNEA	129
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>133</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS</b>	<b>137</b>



## I. RESUMO

A presença de uma córnea saudável e transparente é essencial à função visual, na medida em que constitui o tecido mais anterior do globo ocular e com responsabilidade primordial na refração da luz. O epitélio da córnea é o tecido humano mais ricamente innervado, recebendo nervos sensitivos oriundos do gânglio do nervo trigêmeo e nervos simpáticos oriundos do gânglio cervical superior. Além do papel sensitivo na defesa da integridade da superfície ocular, os nervos desempenham um papel trófico essencial à manutenção dos tecidos oculares, com particular destaque para a córnea. A função específica dos nervos simpáticos na córnea encontra-se ainda pouco caracterizada, e tem sido tradicionalmente considerado que as córneas humanas terão uma contribuição pouco relevante de fibras nervosas autonómicas, ao contrário de outros mamíferos. Foi proposta também a existência de um sistema simpático intrínseco da córnea, tendo em vista a presença de catecolaminas, de enzimas responsáveis pela sua síntese e de adrenoceptores naquele tecido. Tal como a inervação sensitiva, há evidência de que a inervação simpática possa desempenhar um papel neurotrófico na córnea. A queratopatia neurotrófica é a consequência final da agressão local (por exemplo, por trauma, infecção herpética, lentes de contacto) ou sistémica (diabetes mellitus) aos nervos da córnea. A queratite infecciosa pode ocorrer como consequência daquela e é uma das mais importantes causas de cegueira corneana, dependendo a sua evolução e prognóstico da existência de factores de risco particulares.

Enumeraremos a seguir os objectivos sumários desta investigação, definidos progressivamente com a evolução dos trabalhos e a aferição dos resultados: 1) caracterizar os principais factores de risco para infecção da córnea, nomeadamente os associados a disfunção nervosa; 2) desenvolver um modelo experimental de córnea em animal de experiência e reprodutível na córnea humana, para estudo dos mecanismos adrenérgicos e da inervação simpática; 3) estabelecer a origem principal de noradrenalina (NA) na córnea (neuronal ou extra-neuronal); 4) avaliar a libertação neuronal de NA na córnea e caracterizar a sua regulação pré-juncional pelos adrenoceptores alfa-2; 5) caracterizar morfológicamente a inervação simpática na córnea; 6) esclarecer, na regulação adrenérgica da córnea, as contribuições relativas do sistema nervoso simpático e dos mecanismos adrenérgicos locais.

Iniciámos esta investigação indagando sobre os principais factores de risco clínicos, locais e sistémicos, para infecção da córnea. A esse propósito levantámos algumas questões: qual a

prevalência dos factores de risco associados potencialmente a perturbação da inervação corneana? Que consequências clínicas podem daí ser derivadas?

Para o efeito avaliámos os registos de todos os casos de queratite bacteriana ocorridos num período de oito anos e observados na consulta de Oftalmologia do Centro Hospitalar de S. João. Procurámos os respectivos isolamentos microbiológicos e avaliámos a existência de factores de risco locais e sistémicos para a infecção da córnea, com particular destaque para aqueles associados a compromisso da inervação. Como resultados, identificámos a presença de factores de risco em mais de 95% dos casos de queratite infecciosa, com destaque para o trauma, o uso de lentes de contacto e a diabetes mellitus. Todos estes podem produzir lesão nervosa aguda ou crónica e predispor à infecção da córnea. Observámos ainda que a existência de factores de risco conducentes a compromisso nervoso da superfície ocular pode aumentar o risco de infecções oportunistas por microrganismos raros, o que ilustrámos com relatos de casos clínicos. Propusemos a existência de um papel fisiopatológico específico para os agonistas adrenérgicos alfa-2 tópicos, que diminuem a libertação pré-sináptica de NA, e para o papel contributivo da queratopatia bolhosa potenciada pelo compromisso da inervação simpática da córnea. Para além de sublinhar a importância da diabetes enquanto causa de neuropatia somática e autonómica, corroborámos que a queratopatia neurotrófica associada a doença herpética dificulta a reparação epitelial corneana aumentando a probabilidade de sequelas.

Alertados para esta contribuição dos mecanismos simpáticos na fisiologia da córnea saudável e na etiopatogenia de diversas doenças corneanas, enunciámos algumas questões fundamentais: qual é a principal origem das catecolaminas que activam os adrenoceptores da córnea? Como podemos estudá-la utilizando um modelo animal? Qual o modelo mais adequado?

Sendo a córnea um tecido densamente innervado, colocámos a hipótese de que a fonte principal de NA seria a sua libertação a partir de nervos simpáticos intrínsecos, e não a produção local não-neuronal ou a sua captação hematogénea. Para esse efeito começámos por desenvolver um modelo experimental de córnea de Coelho para estudo dos mecanismos adrenérgicos e da inervação simpática. Assim, três segmentos concêntricos (central, intermédio, periférico) foram obtidos por dupla trepanação realizada em córneas de Coelho com 3-4 meses de idade, assim como amostras de humor aquoso e de sangue. As catecolaminas endógenas foram quantificadas por HPLC. Verificámos a existência de um gradiente de concentração para a NA decrescendo da periferia para o centro da córnea de Coelho. Em contraste, tal gradiente não se verificava para a adrenalina (AD). Observámos

ainda ser a NA a mais abundante das duas catecolaminas em todos os segmentos da córnea, enquanto que no plasma a AD predominava. Tomados em conjunto, estes resultados sugeriam que a NA na córnea seria principalmente de origem neuronal.

Procurámos de seguida definir se os resultados encontrados no Coelho seriam reprodutíveis no Homem. Assim, de forma a avaliar as contribuições relativas dos nervos simpáticos *versus* produção não-neuronal, fizemos a mesma comparação das concentrações de catecolaminas incluindo a dopamina (DA), utilizando HPLC, em segmentos concêntricos da córnea, no humor aquoso, e no sangue venoso de humanos e coelhos. Neste protocolo usamos a íris como controlo. Calculámos razões entre os produtos finais enzimáticos e os seus substratos, procurando evidência de síntese activa de catecolaminas. Fizemos ainda ensaios de carregamento de noradrenalina exógena radiomarcada ( $^3\text{H}$ -NA), comparando os resultados antes e após incubação com cocaína (inibidor da captação neuronal) para testar a redução no carregamento típica dos nervos simpáticos. Observámos que os níveis de catecolaminas são cerca de uma unidade logarítmica mais baixos na córnea do Homem do que na córnea de Coelho. Encontrámos na córnea humana o mesmo gradiente de concentração para a NA decrescendo da periferia para o centro, e não verificável para a DA nem para a AD. Verificámos ocorrer redução no carregamento de NA após incubação com cocaína demonstrando a sua origem neuronal e a presença de nervos simpáticos activos na córnea. O mesmo se verificou na íris, validando os resultados obtidos da córnea. O supracitado gradiente de concentração de NA na córnea humana e de Coelho sugere uma distribuição maior de fibras simpáticas na córnea periférica.

Colocaram-se de seguida as questões: há libertação de NA por estimulação dos nervos da córnea e poderá esta ser modulada por adrenoceptores alfa-2 pré-sinápticos? Qual é a relevância funcional e a topografia precisa da inervação simpática?

O estudo de efeitos pré-juncionais foi realizado com a incubação de córneas humanas e de Coelho com  $^3\text{H}$ -NA, seguindo-se a aplicação de estimulação eléctrica para avaliar a indução da libertação de NA; foi posteriormente adicionado um antagonista dos adrenoceptores alfa-2 (rauvolscina). Noutro protocolo experimental, a NA e AD endógenas foram quantificadas por HPLC em secções lamelares da córnea (epitélio, estroma, endotélio). Por fim, estudámos a morfologia nervosa em ensaios de imunofluorescência com observação directa por microscopia confocal. Demonstrámos a ocorrência de libertação neuronal de NA por estimulação eléctrica na córnea e a sua modulação por autoreceptores alfa-2 pré-sinápticos: a adição de um antagonista alfa-2, embora não produzindo efeito na libertação basal de NA, aumenta a libertação electricamente induzida de NA de modo dependente da concentração.

Estes resultados demonstram a existência de um mecanismo mediado por adrenocetores alfa-2 que regula a libertação neuronal de NA na córnea. Considerando as secções lamelares da córnea, verificámos que a NA predomina significativamente sobre a DA, particularmente no endotélio (captada a partir do humor aquoso, depois de libertada pelos nervos simpáticos da íris) e no epitélio (principalmente de origem neuronal, com alguma captação por células epiteliais, não obstante poderem estas ter alguma capacidade de síntese de NA). Estabelecemos assim que a inervação simpática é a via fisiológica mais importante para a origem de NA na córnea, em detrimento dos mecanismos adrenérgicos locais. Determinámos ainda que a inervação simpática tem relevância funcional semelhante na córnea humana e na de Coelho, conforme inferido pela quantidade de NA radiomarcada libertada por estimulação (da mesma ordem de grandeza em ambas as espécies). Do ponto de vista morfológico, verificámos que as fibras simpáticas têm localização preferencial no estroma anterior e na periferia da córnea, estendendo-se até à camada basal do epitélio; há uma total ausência de inervação sensitiva e autonómica no estroma posterior e no endotélio.

O conjunto de resultados supracitado demonstra a importância basilar da inervação simpática, em associação à inervação somática, na fisiologia da córnea, podendo o seu compromisso em diversas doenças produzir disfunção grave do tecido e perda visual.

## II. ABSTRACT

The presence of a healthy and transparent cornea is essential to visual function, as it constitutes the most anterior tissue of the eyeball and primarily responsible for light refraction. The corneal epithelium is the most innervated human tissue, receiving sensory nerves from the trigeminal nerve ganglion and sympathetic nerves from the superior cervical ganglion. In addition to a sensory role, paramount for the integrity of the ocular surface, the ocular nerves play an essential trophic role as maintainers of ocular tissues, in particular the cornea. The specific function of sympathetic nerves in the cornea is still poorly characterised, and it has traditionally been considered that human corneas have an insignificant contribution of autonomic nervous fibres, unlike other mammals. It has also been proposed the existence of an intrinsic sympathetic corneal system, taking into account the presence of measurable levels of catecholamines, of enzymes responsible for their synthesis and of adrenoceptors in the cornea. There is evidence that sympathetic innervation, like its sensory counterpart, plays a neurotrophic role in the cornea. Neurotrophic keratopathy is the final consequence of local (eg trauma, herpes, contact lens) or systemic (diabetes mellitus) damage to corneal nerves. Infectious keratitis can occur as a complication of neurotrophic keratopathy and is one of the most important causes of corneal blindness, and its evolution and prognosis is influenced by several risk factors.

The following are principal objectives of this investigation: 1) to characterize main risk factors for corneal infection, namely those associated with nerve dysfunction; 2) to develop an experimental animal model of the cornea adequately reproducible in Humans, in order to study adrenergic mechanisms and sympathetic innervation; 3) to establish the main origin of noradrenaline (NA) in the cornea (neuronal or other); 4) to evaluate the neuronal release of NA in the cornea and to assess its pre-junctional regulation by alpha-2 adrenoceptors; 5) to characterize the morphology of corneal sympathetic innervation; 6) to clarify the relative contributions of the sympathetic nervous system and local adrenergic mechanisms in the cornea.

We began this investigation by studying the main local and systemic risk factors for corneal infection. In this regard some questions were raised: what is the prevalence of risk factors potentially associated with disturbed corneal innervation? What clinical consequences can be derived?

For this purpose, we evaluated the records of all cases of bacterial keratitis occurring in a period of eight years and observed at the Ophthalmology clinic of Centro Hospitalar de S. João. We searched for respective microbiological isolates and assessed the existence of local and systemic risk factors for corneal infection, with particular emphasis on those associated with innervation's compromise. As a result, we identified the presence of risk factors in more than 95% of cases of infectious keratitis, particularly trauma, contact lens wear and diabetes mellitus, all of which can produce acute or chronic nerve damage and predispose to corneal infection. We also observed that the existence of risk factors leading to nervous compromise of the ocular surface may increase the risk of opportunistic infections by rare microorganisms, which we have subsequently illustrated with case reports. We have thus proposed the existence of a specific pathophysiological role for topical alpha-2 adrenergic agonists, which reduce presynaptic release of NA, and ventured on the contributory role of bullous keratopathy enhanced by sympathetic nerve dysfunction. In addition to stressing the importance of diabetes as a cause of somatic and autonomic neuropathy, we have also found that neurotrophic keratopathy secondary to previous herpetic disease delays corneal epithelial repair and increases the likelihood of sequelae.

Given the physiological contribution of sympathetic mechanisms for corneal health and the consequences of their dysfunction as seen in several corneal diseases, we have thus asked some fundamental questions: what is the main origin of catecholamines that activate corneal adrenoceptors? How can we test this hypothesis using an animal model? What is the most suitable model?

Since the cornea is a densely innervated tissue, we hypothesized that the main source would be the neuronal release of NA from intrinsic sympathetic nerves, rather than local non-neuronal production or hematogenous uptake. To this end we developed an experimental rabbit's cornea model for the study of adrenergic mechanisms and sympathetic innervation. Thus, three concentric segments (central, intermediate, peripheral) were obtained by double trepanation performed on rabbit corneas aged 3-4 months, as well as aqueous and blood humor samples. Endogenous catecholamines were quantified by HPLC. We found a concentration gradient for NA decreasing from the periphery to the center of the rabbit cornea. In contrast, such gradient did not occur for adrenaline (AD). We also observed that NA was the most abundant of the two catecholamines in all corneal segments, whereas in the plasma AD predominated. Taken together, these results suggested that NA in the cornea would be primarily of neuronal origin.



We then sought to determine if the results found in the rabbit would be reproducible in man. Thus, in order to evaluate the relative contributions of sympathetic nerves versus non-neuronal production, we compared the catecholamine concentrations including dopamine (DA) measured by HPLC in concentric corneal segments, aqueous humor, venous blood, and also the iris as a control tissue, both in humans and rabbits. We determined ratios between enzymatic end products and their substrates, looking for evidence of active catecholamines synthesis. We further performed assays of radiolabelled exogenous noradrenaline ( $^3\text{H}$ -NA) loading, comparing the results before and after cocaine incubation (neuronal uptake inhibitor) to test for the reduction in loading typical of sympathetic nerves. We observed that catecholamine levels are about one log unit lower in the human cornea than in the rabbit cornea. We found the same concentration gradient for NA descending from the periphery to the center in the human cornea, also not occurring for AD nor AD. We found a reduction in NA loading after incubation with cocaine demonstrating its neuronal origin and the presence of active sympathetic nerves in the cornea. The same occurred in the iris, validating the corneal results. The aforementioned NA concentration gradient in the human and rabbit cornea suggests a greater distribution of sympathetic fibres to the peripheral cornea.

Some additional questions arose: can NA be released by corneal nerve stimulation and could this be modulated by presynaptic alpha-2 adrenoceptors? What is the functional relevance and precise topography of sympathetic innervation?

The study of pre-junctional effects was performed after incubation of human and rabbit corneas with  $^3\text{H}$ -NA, followed by application of electrical stimulation to evaluate the induction of NA release; rauwolscin was subsequently added as an alpha-2 adrenoceptor antagonist. In a separate experiment, endogenous NA and AD were quantified by HPLC in lamellar sections of the cornea (epithelium, stroma, endothelium). Nerve morphology was also studied in immunofluorescence assays with direct observation by confocal microscopy. We have demonstrated the occurrence of neuronal NA release by corneal electrical stimulation and its modulation by presynaptic alpha-2 autoreceptors: the addition of an alpha-2 antagonist, whilst not having an effect on basal NA release, increases the electrically induced release of NA in a concentration-dependent manner, demonstrating the existence of an alpha-2 adrenoceptor-mediated mechanism that regulates neuronal release of NA in the cornea. Regarding corneal lamellar sections, we found that NA predominates significantly over AD, particularly in the endothelium (captured from the aqueous humor, after being released by sympathetic nerves in the iris) and in the epithelium (mainly of neuronal origin, although some epithelial cells may have hypothetical NA-synthesizing capability). We have thus established that sympathetic innervation is the most important physiological pathway for NA's origin in the cornea, with a

lesser role of local adrenergic mechanisms. We have also found that sympathetic innervation has similar functional relevance in human and rabbit corneas, as inferred by the amount of radiolabelled NA released by stimulation (of the same order of magnitude in both species). From a morphological standpoint, we found that sympathetic fibres are preferentially located in the anterior stroma, mainly in the peripheral cornea, and extend to the basal layer of the epithelium; there is complete absence of sensory and autonomic innervation in the posterior stroma and endothelium.

The aforementioned set of results demonstrate the fundamental importance of sympathetic innervation, in association with its somatic counterpart, in corneal physiology, and its commitment in several diseases can produce severe tissue dysfunction and visual loss.

### III. INTRODUÇÃO

Cerca de 80% da experiência sensorial humana ocorre através da visão, desempenhando esta um papel determinante nas mais variadas vertentes do quotidiano. A visão normal ocorre através de um processo biológico complexo que compreende a formação adequada de uma imagem a partir de fotões. Nesse processo desempenham acções indispensáveis o globo ocular e o sistema nervoso central, ligados através do nervo óptico. O globo ocular tem a capacidade de focar e transformar estímulos luminosos (fototransdução) em impulsos eléctricos nervosos, os quais são depois conduzidos até ao córtex occipital onde são finalmente convertidos em percepção visual.

Os diversos tipos celulares e tecidos que compõem o olho apresentam uma diferenciação muito específica, e o seu normal desenvolvimento e funcionamento são essenciais para uma função visual adequada. A córnea e o cristalino, juntamente com o humor aquoso e o corpo vítreo, formam um sistema óptico sofisticado cuja função é a focagem precisa da radiação luminosa sobre a retina. Deste sistema óptico, a córnea é a estrutura mais relevante, uma vez que é responsável por cerca de dois terços do poder refractivo do olho humano.

A este propósito, as estruturas supracitadas são frequentemente sede de doença em todas as faixas etárias e em diferentes contextos epidemiológicos, sendo que diversos processos patológicos podem coexistir. Não obstante existirem opções terapêuticas para muitas dessas patologias, a edificação de um entendimento progressivo sobre a fisiologia e homeostasia do tecido saudável e a etiopatogenia da disfunção e doença é condição absolutamente necessária para orientar a Medicina de um ponto de vista curativo e reactivo para um ponto de vista preventivo e pro-activo.

#### Sobre a córnea

A córnea constitui a parte mais anterior do invólucro fibroso externo do olho humano, representando cerca de um sexto da área total da superfície do globo, enquanto a esclera representa a restante área (Gipson and Joyce, 2008). É formada por tecido conjuntivo cuja função é garantir a integridade estrutural do globo ocular e proteger os seus tecidos internos. A córnea e o cristalino são as estruturas de refacção primária do olho e ambas possuem duas

propriedades ópticas fundamentais para esse fim – potência refractiva (refracção da luz) e transparência (transmissão da luz). A presença de uma córnea saudável é consequentemente essencial para uma boa visão, na medida em que constitui a porta de entrada da luz no globo ocular.

A córnea tem 540 a 700 micrómetros de espessura e está disposta em cinco camadas fundamentais – epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio – cada uma tendo características estruturais e funcionais distintas (Hogan et al., 1971). Em termos histológicos, a córnea é composta por três tipos celulares principais – células epiteliais, queratócitos estromais e células endoteliais. O epitélio e o endotélio representam barreiras celulares ao tecido estromal, sendo a resistência destas camadas à passagem de solutos e de fluído de considerável importância na manutenção da função normal da córnea (resistência relativa à difusão de solutos e fluxo de fluído: epitélio [2000] >> endotélio [10] > estroma [1]). Todos os três tipos celulares podem replicar-se através de mitoses, mas variam consideravelmente na sua capacidade proliferativa *in vivo*, possuindo as células epiteliais a maior taxa de divisão celular enquanto as células endoteliais são as menos renováveis. Este facto tem implicações clínicas importantes, pois as células epiteliais podem regenerar-se completamente após lesão (por exemplo, erosões corneanas), mas com a desvantagem de a elevada taxa mitótica poder ocasionalmente originar transformação neoplásica (por exemplo, a neoplasia escamosa da superfície ocular). As células endoteliais, como resultado da limitada proliferação *in vivo*, podem ser mais vulneráveis a doenças corneanas relacionadas com a idade (por exemplo, a distrofia endotelial de Fuchs) ou a trauma (por exemplo, por cirurgia intra-ocular). A perda ou disfunção das células endoteliais resulta em permeabilidade aumentada aos fluídos (edema da córnea e queratopatia bolhosa). Os queratócitos do estroma representam um meio-termo, em termos de capacidade replicativa, entre estes dois extremos.

A superfície externa da córnea é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado (Gipson and Joyce, 2008). Ao contrário de outras superfícies epiteliais, o epitélio da córnea especializou-se em sobreviver sobre uma superfície avascular refractiva, húmida, transparente não sendo, portanto, queratinizado. O epitélio é constituído por quatro a seis camadas celulares, numa espessura total de cerca de 50 micrómetros. As células epiteliais basais secretam activamente uma membrana basal, com cerca de 90 nanómetros de espessura ao nascimento, composta por fibrilas de colagénio tipo IV, laminina, sulfato de heparina e fibronectina, a qual aumenta de espessura com a idade até cerca de 300

nanómetros no final da idade adulta (Alvarado et al., 1983). Estima-se que as células epiteliais sejam completamente renovadas a cada sete a dez dias, num processo alicerçado no equilíbrio entre a proliferação e a migração horizontal das células límbicas, a migração horizontal de células epiteliais da camada basal e a proliferação vertical terminal de células pavimentosas superficiais, com posterior descamação para o filme lacrimal (Hanna and O'brien, 1960; Schermer et al., 1986). Tal delicado equilíbrio é crítico para a manutenção de uma superfície epitelial lisa e uniforme.

No reino animal, a transparência tecidular é uma característica pouco comum, sendo praticamente exclusiva do globo ocular (Foster et al., 2005; Gipson and Joyce, 2008). De facto, as únicas estruturas humanas com essa propriedade localizam-se no olho (sendo os melhores exemplos a córnea, o cristalino e o vítreo). No caso específico da córnea, a transparência deve-se ao arranjo extremamente regular, tipo *lattice*, das fibrilas de colagénio do estroma, combinado com a transparência da própria população celular (epitelial, estromal e endotelial) residente na córnea (Maurice, 1957; Meek et al., 2003; Piatigorsky, 2001).

As células epiteliais têm origem na maturação ontogenética de células epiteliais progenitoras límbicas, as quais constituem uma sub-população de células-tronco estaminais, caracteristicamente indiferenciadas, de ciclo celular lento mas com elevado potencial proliferativo (Cotsarelis et al., 1989). Localizam-se nas paliçadas de Vogt, nichos caracterizados por um micro-ambiente protector e altamente regulado (Boulton et al., 2013; Lavker et al., 2004). As células-tronco originam as células amplificadoras transitórias, que são essencialmente células epiteliais basais da região límbica que migram centripetamente para originar a camada basal do epitélio corneano.

O estroma corneano é responsável por 90% da espessura da córnea. É predominantemente composto por água (3.5 gramas de água por grama de peso seco) e estabilizado por uma rede estrutural de substâncias extracelulares e celulares insolúveis e solúveis. O peso seco do estroma corneano humano é composto por colagénio, constituintes de queratócitos, proteoglicanos, constituintes de nervos, glicoproteínas e sais (Maurice, 1957). De modo geral, tais componentes da córnea actuam em conjunto para estabelecer e manter uma córnea transparente. Embora a córnea absorva principalmente a luz ultravioleta, tem a capacidade de transmitir quase toda a luz visível (400-700 nanómetros) e infravermelha até um comprimento de onda de 2500 nanómetros, sendo o seu pico de transmissão de 85-99% no espectro visível (Boettner and Wolter, 1962; Lerman, 1984).

A microscopia confocal *in vivo* sugere que a maioria da dispersão (*scatter*) da luz deve-se aos componentes celulares da córnea e não à matriz extracelular. De facto, uma maior dispersão da luz ocorre onde as diferenças entre os índices refractivos são mais elevadas, como na interface ar-filme lacrimal (Jester, 2008). No estroma corneano, a dispersão da luz provém predominantemente da interface entre a membrana plasmática das células nervosas e a matriz extracelular e da interface entre o citoplasma e o núcleo dos queratócitos. Em situações de edema ou cicatrização da córnea, a perda de transparência deve-se principalmente a alterações nas características de dispersão da luz dos queratócitos, e não a alterações na matriz extracelular (Møller-Pedersen, 2004). Nestas condições, o corpo celular e os processos dendríticos dos queratócitos produzem consideravelmente mais dispersão da luz do que em córneas normais.

Os queratócitos constituem o segundo maior componente do peso seco do estroma da córnea (o primeiro sendo o colagéneo e o terceiro os proteoglicanos). Têm forma estrelada e são constituídos por um corpo celular de 15 a 20 micrómetros de diâmetro com numerosos processos dendríticos que se estendem até 50 micrómetros a partir do corpo celular. Localizam-se entre as lamelas de colagéneo formando um sincício fechado e altamente organizado. Estas células funcionam como fibroblastos modificados no período neonatal (altura em que representam 20% do volume estromal), formando a maior parte da matriz extracelular do estroma. Posteriormente, permanecem no estroma corneano ao longo da vida como fibrócitos modificados, onde são responsáveis pela manutenção da matriz extracelular. Os queratócitos podem ser metabolicamente activados a um fenótipo fibroblástico em situações de lesão tecidular. Uma vez activados, exibem uma ampla gama de respostas celulares, incluindo aumento da proliferação, da actividade proteolítica e colagenolítica, da fagocitose, da produção de citocinas quimiotácticas (interferão, prostaglandinas, factor 1 do complemento) e da secreção de fibronectina, colagéneo e proteoglicanos (Mishima et al., 1987; Mohan et al., 2003; Taylor et al., 1982; Woost et al., 1985). O estroma corneano humano no adulto tem aproximadamente 2.4 milhões de queratócitos, ocupando 10% do volume estromal, e comunicando entre si através de junções especializadas presentes nos processos dendríticos (Møller-Pedersen et al., 1994; Watsky, 1995). Trabalhos recentes demonstraram a presença de uma sub-população residente de células estaminais estromais adultas, progenitoras dos queratócitos, localizadas principalmente na periferia do estroma corneano, adjacente ao limbo (Du et al., 2007, 2005). Tal facto sugere uma potencial explicação para a renovação lenta e progressiva dos queratócitos estromais verificada após lesão tecidular

traumática ou iatrogénica (por exemplo, em casos de cirurgia querato-refractiva, queratoplastia penetrante ou uso de antimitóticos como a mitomicina C).

Foi ainda descrita a presença, no estroma da córnea, de células imunológicas derivadas da medula óssea: células dendríticas “profissionais” (designadas habitualmente como células de Langerhans, caracterizam-se por uma elevada expressão constitucional de MHC classe II e outras moléculas co-estimulatórias), células dendríticas “não profissionais” e histiócitos (Gillette et al., 1982; Hamrah et al., 2003; Muller et al., 1995). Estas células apresentadoras de antígenos parecem desempenhar um papel fundamental na indução da tolerância imunológica versus activação da imunidade celular, e os histiócitos estromais desempenham adicionalmente um papel efector na imunidade inata como células fagocíticas.

O endotélio representa uma monocamada de células hexagonais oriundas da crista neural e localizadas na superfície posterior da córnea. A sua principal função é manter a transparência da córnea regulando a hidratação e a nutrição da córnea constituindo-se como uma barreira semi-permeável regulada através de uma bomba metabólica (ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) (Gipson and Joyce, 2008). A hipótese “*pump-leak*” sugere basicamente que é necessário um equilíbrio entre a quantidade de líquido que flui passivamente para a córnea e a energia despendida na remoção do seu excesso de forma a assegurar a manutenção da transparência da córnea e um estado de relativa desidratação fisiológica do estroma corneano (78% de água). As células endoteliais secretam também uma membrana basal localizada anteriormente, a membrana de Descemet, e uma camada de glicocálice localizada posteriormente, em contacto íntimo com o humor aquoso (Foster et al., 2005). As células endoteliais têm numerosos organelos intra-citoplasmáticos, com destaque para as mitocôndrias, possuindo uma das mais elevadas taxas de metabolismo aeróbio de entre todas as células do globo ocular, ultrapassada apenas pelos fotorreceptores da retina (Hogan et al., 1971). Ao nascimento, a densidade celular endotelial central da córnea é de cerca de 5000 células por milímetro quadrado (Edelhauser, 2000). Subsequentemente, em primatas e mamíferos superiores, incluindo o Homem, ocorre maturação da população endotelial com perda de grande parte da sua capacidade proliferativa. Para tal concorrem factores como a inibição de contacto, concentrações elevadas de TGF- $\beta$  no humor aquoso e a própria senescência celular gradual relacionada com a idade, particularmente nas regiões centrais da córnea. Não obstante, estudos recentes sugeriram a existência, no adulto, de uma população de células estaminais progenitoras das células endoteliais, localizada perto da linha de Schwalbe (adjacente ao limbo), numa zona de transição entre a malha trabecular e a periferia endotelial, e que retêm capacidade

proliferativa limitada, particularmente após lesão tecidual (McGowan et al., 2007; Whikehart et al., 2005). Na infância, ao crescimento da córnea alia-se a apoptose de certos tipos celulares especializados, e em consequência a densidade celular endotelial central diminui significativamente para cerca de 3500 células por milímetro quadrado aos 5 anos de idade e para 3000 células por milímetro quadrado aos 14–20 anos de idade (Armitage et al., 2003; Yee et al., 1985). Tal significa que o número total de células endoteliais da córnea e a densidade central diminuem em média cerca de 50% desde o nascimento até à morte, em indivíduos normais, sem que tal origine doença ou patologia da córnea. Considerando que a descompensação endotelial com edema corneano secundário não ocorre em regra até que a densidade celular central seja inferior a 500 células por milímetro quadrado, tal sugere a existência de reserva celular e vitalidade suficientes para a esperança de vida humana actual de 75 a 80 anos (Armitage et al., 2003). Uma vez que o endotélio mantém a sua continuidade estrutural por migração e alongamento das células sobreviventes de forma a recobrir uma maior área de superfície, resulta de tal facto que a percentagem de células hexagonais diminui (pleomorfismo) e que o coeficiente de variação da área celular aumente (polimegatismo) ao longo dos anos (Yee et al., 1985). A isto acresce o facto de a impermeabilidade elevada do epitélio e moderada do endotélio dificultarem significativamente a difusão de electrólitos e o fluxo de líquido no estroma, de tal forma que as bombas metabólicas endoteliais conseguem manter a hidratação do estroma no intervalo normal de 78% sem esforço significativo.

Do ponto de vista antropométrico e topográfico, há variações significativas a registar na córnea ao longo da vida. No recém-nascido de termo, o diâmetro horizontal da córnea é de cerca de 9.8 milímetros e a área da superfície da córnea é de cerca de 102 milímetros quadrados, constituindo aproximadamente 75-80% do tamanho da córnea humana adulta, enquanto o segmento posterior do olho representa menos de 50% do tamanho do do adulto (Gordon and Donzis, 1985). Ao nascimento, as espessuras centrais das várias camadas da córnea são aproximadamente: epitélio com quatro camadas celulares 50 micrómetros; membrana de Bowman 10 micrómetros; estroma central 500 micrómetros; membrana de Descemet 4 micrómetros e endotélio 6 micrómetros (representando uma espessura total central da córnea de cerca de 570 micrómetros). Durante a infância, a córnea continua o processo de crescimento, atingindo o tamanho adulto por volta dos dois anos de idade com um diâmetro horizontal de 11.7 milímetros, área superficial de 138 milímetros quadrados, curvatura da superfície anterior média de 44.1 dioptrias e espessura central média de 544 micrómetros (Doughty et al., 2002; Gordon and Donzis, 1985). Depois deste período, poucas alterações ocorrerão em termos de tamanho, forma, transparência ou curvatura, embora uma



mudança do padrão de astigmatismo de “a favor-da-regra” para “contra-a-regra” se associe ao processo de senescência (Hayashi et al., 1995; Niederer et al., 2007). Neste processo participam algumas alterações estruturais, incluindo: (1) crescimento ou espessamento da membrana basal epitelial de 100 a 300 nanómetros, numa taxa de aproximadamente 30 nanómetros por década de vida; (2) diminuição do número de queratócitos, de fibras nervosas sub-basais e da densidade de células endoteliais, presumivelmente induzida por factores diversos de *stress* ambiental; (3) aumento da rigidez e resistência do estroma pelo aumento do *crosslinking* das fibrilas de colagénio por mediação enzimática e não enzimática (glicosilação associada à idade); (4) espessamento da membrana de Descemet em 6 a 11 micrómetros adicionais, numa taxa de aproximadamente 1 micrómetro por década de vida; e (5) alterações degenerativas da matriz extracelular (Faragher et al., 1997; Niederer et al., 2007). Tais alterações estruturais e celulares, no entanto, afectam minimamente as funções ópticas e de barreira da córnea e, curiosamente, podem contribuir para a melhoria das propriedades mecânicas e estruturais. Nesta linha de evidência, cite-se que a ocorrência de doenças ectásicas da córnea não induzidas cirurgicamente, como o queratocone, é rara após os 40 anos de idade. Não obstante, algumas consequências funcionais negativas decorrem deste processo de senescência – a reparação tecidual e a cicatrização não são tão eficientes, há diminuição da sensibilidade da córnea e a elasticidade e expansibilidade do tecido reduzem-se consideravelmente (Daxer et al., 1998; Malik et al., 1992; Møller-Pedersen, 1997). Quando visualizada anteriormente no olho humano adulto, a córnea tem aparência elíptica, pois o maior diâmetro corresponde tipicamente no meridiano horizontal (média de 11.7 milímetros) e o menor ao meridiano vertical (média de 10.6 milímetros) (Foster et al., 2005). Esta configuração elíptica deve-se à extensão anterior da esclera opaca sobretudo a nível superior e inferior. Quando visualizada a partir da superfície posterior, a córnea é na realidade de aspecto circular, com um diâmetro horizontal e vertical médio de 11.7 milímetros. O raio de curvatura médio da superfície anterior e posterior da córnea é de 7.8 milímetros e 6.5 milímetros, respectivamente, sendo significativamente menor que o raio de curvatura médio de 11.5 milímetros da esclera. Tal produz uma zona de transição de 1.5 a 2 milímetros formando um sulco externo e interno da superfície, ou sulco escleral, onde a córnea mais íngreme se encontra com a esclera mais plana. Este sulco não é clinicamente evidente porque é recoberto por vasos e tecido episcleral e pela inserção da conjuntiva. Do ponto de vista histológico esta zona de transição denomina-se limbo, e tem cerca de 1.5 milímetros de largura no meridiano horizontal e 2 milímetros de largura no meridiano vertical. É nesta região que se localizam as populações adultas de células estaminais da córnea, encontrando-se na sua profundidade a malha trabecular, a via de drenagem convencional do humor aquoso. O

limbo é alvo frequente de patologia em várias doenças imunomediadas (Pavesio and Meier, 2001), e é também uma importante referência anatómica para entrada cirúrgica no segmento anterior, porque é clinicamente identificável como uma zona de transição azul entre a córnea e a esclera. Portanto, uma incisão anterior à zona azul localiza-se anatomicamente na córnea periférica, anterior à malha trabecular e aos nichos celulares estaminais. A córnea é mais fina no seu centro, medindo em média  $544 \pm 34$  micrómetros (intervalo 440-650 micrómetros na paquimetria ultrassónica), e aumenta de espessura perifericamente até cerca de 700 micrómetros ao nível do limbo (Foster et al., 2005; Hogan et al., 1971). Uma meta-análise da generalidade dos trabalhos que estudaram a espessura da córnea ao longo de um período de 30 anos revelou que não parecem ocorrer diferenças significativas na espessura corneana central, relacionada com idade, para além da infância (Doughty and Zaman, 2000).

A superfície anterior da córnea é basicamente de geometria esférica e prolata, constituindo o ápex da córnea o ponto de maior poder refractivo, onde a curvatura é mais acentuada, sendo que esta se vai aplanando em direcção periférica (Foster et al., 2005). A área central da córnea, diante da abertura pupilar da íris (que é na realidade uma imagem virtual da pupila real e tipicamente localizada 0.5 milímetros anterior e 14% maior que a pupila real), contém a zona óptica central ou efectiva da córnea. Tal designação deve-se ao facto de a luz aí refractada, proveniente de um alvo distante ou próximo, ser enviada através da pupila directamente para a fóvea. A localização e o tamanho desta zona óptica central mudam dinamicamente de acordo com a localização do alvo de fixação em relação à córnea (por exemplo, a um alvo de fixação mais distante corresponde uma zona óptica central de maior diâmetro), numa interacção estreita com o diâmetro da pupila e respectiva influência das condições de iluminação e da proximidade do alvo de fixação. O diâmetro desta zona óptica central é em média de  $3.6 \pm 0.8$  milímetros em condições fotópicas e de  $5.8 \pm 0.9$  milímetros em condições escotópicas, numa amplitude potencial de 1.5 a 9.0 milímetros dependendo das condições de iluminação (Kjesbu et al., 2005; Winn et al., 1994). O poder dióptrico dos quatro milímetros centrais da córnea representa cerca de  $42.4 \pm 1.5$  dioptrias (variação 38.4–46.3 dioptrias) do poder dióptrico total do olho humano de cerca de 60 dioptrias (Atchison, 2017; Ho et al., 2008). A restante córnea constitui a zona óptica periférica, a qual pode igualmente refractar a luz através da pupila, mas em ângulos habitualmente mais agudos que apenas permitem a estimulação de zonas mais periféricas da retina, incluindo a mácula extra-foveal (não obstante a interferência variável da íris e do diâmetro pupilar); a córnea periférica dificilmente contribui directamente para a visão foveal (Fountain, 2008).

## Sobre a inervação da córnea

A inervação sensitiva do olho é da responsabilidade de neurónios sensitivos primários localizados no gânglio do nervo trigémeo. A maioria destes é destinada à córnea e representa cerca de 1.5% do número total de neurónios do gânglio trigeminal (De Felipe et al., 1999).

Os nervos sensitivos entram no globo ocular principalmente através dos nervos ciliares longos e curtos (contendo uma mistura de fibras nervosas sensitivas, simpáticas e parassimpáticas) e alcançam todos os tecidos oculares, à excepção do cristalino e da retina. A maioria das fibras sensitivas oculares é destinada à córnea, convergindo na junção esclero-corneana para formar plexos perilímbicos ou pericorneanos. Estas fibras são funcionalmente heterogéneas e incluem unidades sensitivas mecanorreceptoras, nociceptoras polimodais e receptoras térmicas. Consequentemente, respondem a uma variedade ampla de estímulos físicos e químicos (Müller et al., 2003). Os potenciais de acção originados nos neurónios sensitivos periféricos do olho são transmitidos a neurónios de segunda ordem localizados no núcleo caudal do trigémeo ao nível do tronco cerebral. A informação sensitiva é enviada posteriormente a áreas de retransmissão no núcleo talâmico posterior contralateral de onde alcança finalmente o córtex.

A dor é a principal sensação associada à estimulação dos nervos sensitivos oculares, embora a sensação de tacto possa ser produzida na conjuntiva, assim com a sensação térmica de frio pode ser originada pelo arrefecimento da superfície da córnea. As terminações nervosas sensitivas livres, particularmente no epitélio da córnea, são sujeitas a um processo de remodelação contínua. Em situações de estimulação nóxica repetida ou lesão tecidular, os nociceptores polimodais podem estar na origem de dor persistente e hiperalgesia, provavelmente por um mecanismo de hipersensibilização. São também um importante contributo para a inflamação local através da libertação antidrómica de neurotransmissores peptídicos armazenados nas terminações nervosas periféricas (apropriadamente designada como “inflamação neurogénica”), os quais promovem vasodilatação e recrutamento quimiotáctico celular para o tecido.

O epitélio da córnea é na realidade o tecido humano mais ricamente innervado, com estimativas entre 7000 e 16000 terminais nervosos por milímetro quadrado (aproximadamente 2.2 milhões de terminações nervosas), numa densidade nervosa 300 a 400 vezes superior à da pele (Acosta et al., 2001; Beuerman and Tanelian, 1979). Esta abundante inervação fornece à

córnea um sistema de detecção de elevada sensibilidade, sugerindo-se que a lesão de uma única célula epitelial possa ser suficiente para desencadear a percepção de dor. A densidade dos terminais nervosos e, portanto, a sensibilidade corneana são maiores na córnea central, diminuindo progressivamente em direcção à periferia (Marfurt et al., 2010).

A córnea é desprovida de inervação sensitiva até cerca do quinto mês de gestação (Bee, 1982). Os sinais moleculares que controlam o crescimento dos nervos oculares permanecem em grande parte pouco caracterizados, embora várias moléculas de sinalização possam regular o processo. Semaforinas derivadas de células corneanas e do cristalino parecem mediar uma fase inicial de repulsão dos axónios sensitivos do trigémeo da córnea (Lwigale and Bronner-Fraser, 2007), induzindo assim a formação de um anel nervoso pericorneano, e contribuirão também para o posicionamento de um subgrupo de projecções axonais na fissura corioideia, formando um plexo ventral responsável pela posterior inervação da íris (Kirby et al., 1978). Após a formação do anel pericorneano, os nervos sensitivos entram na córnea como feixes uniformemente espaçados em redor de toda a circunferência e estendem-se radial e centripetamente. A profundidade à qual os nervos entram no estroma corneano correlaciona-se com a área posteriormente inervada, sendo que os nervos estromais mais profundos inervam quase toda a superfície corneana, enquanto os nervos mais superficiais, entrando ao nível do estroma subepitelial, suprem a periferia da córnea (Riley et al., 2001). A separação uniforme entre os feixes nervosos da córnea durante a embriogénese parece dever-se à libertação de factores neuro-repulsivos por projecções nervosas pioneiras à medida que avançam do anel perilímbico em direcção ao estroma, mantendo os feixes nervosos subsequentes como raios centrípetos e devidamente separados. A posterior bifurcação dos fascículos nervosos em zonas sucessivas e concêntricas é também influenciada pela composição estromal e por factores neurotróficos libertados pelas células epiteliais, regulando a densidade e a orientação dos nervos corneanos durante o desenvolvimento (Chan et al., 1990; Leiper et al., 2009).

A anatomia dos feixes nervosos que entram radialmente no estroma corneano é bastante semelhante nos mamíferos, variando apenas em número (6–8 no Rato, 15–40 no Gato ou Cão, até cerca de 60 no Homem) (Müller et al., 1996; Sasaoka et al., 1984). Os nervos estromais formam fascículos rodeados por uma lâmina basal e por células de Schwann e arborizam-se precocemente. Os axónios mielinizados (cerca de 20% das fibras estromais) perdem a bainha de mielina cerca de um milímetro após penetrarem no estroma. Um axónio estromal individual entrando no limbo córneo-escleral sofre ramificação repetitiva e pode

percorrer até três quartos da córnea antes de terminar. Em consequência, os campos receptivos individuais das fibras sensitivas da córnea variam consideravelmente (de menos de 1 milímetro quadrado até cerca de 50 milímetros quadrados), podendo cobrir até 25% da superfície da córnea. A extensa ramificação explica ainda a significativa sobreposição de campos receptivos verificada em estudos eletrofisiológicos de fibras nervosas individuais da córnea (Marfurt et al., 2010). Os ramos distais das arborizações estromais anastomosam-se extensivamente, formando o plexo nervoso estromal anterior, uma rede densa e complexa resultante da intersecção de feixes nervosos pequenos e médios e de axónios individuais sem orientação preferencial e localizada nos 25 a 50% anteriores do estroma corneano. Em contraste, a metade posterior do estroma corneano e do endotélio no Homem são desprovidos de fibras nervosas sensitivas (Zander and Weddell, 1951). Apesar da ramificação considerável, a maioria dos feixes nervosos passa ininterruptamente através do estroma em direcção ao epitélio sem aparentemente fornecer inervação funcional ao tecido estromal. Não obstante, uma pequena proporção de fibras nervosas parece terminar no estroma em estruturas que se assemelham a terminações nervosas livres.

Em humanos e mamíferos superiores, a camada mais superficial do plexo nervoso estromal anterior, imediatamente abaixo da membrana de Bowman, é particularmente densa e constitui o plexo nervoso sub-epitelial, sendo a sua densidade nervosa em geral mais elevada na periferia do que no centro da córnea. Daí, cerca de 400 a 500 feixes de tamanho médio penetram a membrana de Bowman principalmente na córnea periférica e intermédia, perdem o revestimento de células de Schwann, curvam em ângulo de 90° e dividem-se em 2 a 20 fascículos nervosos que entram no epitélio formando o plexo nervoso sub-basal. Um número relativamente pequeno de nervos estromais penetra a membrana de Bowman no centro da córnea, sendo que esta região é innervada sobretudo por nervos sub-basais longos que penetram directamente na córnea periférica a partir do plexo perilímbico. O plexo nervoso sub-basal em humanos é formado por 5000 a 7000 fascículos nervosos numa área de cerca de 90 milímetros quadrados. Os seus vários ramos laterais produzem 3 a 7 axónios individuais (resultando num número total de axónios sub-basais entre 20000 e 44000) (Müller et al., 2003). Esta ramificação em fascículos nervosos múltiplos e paralelos constitui uma estrutura neuroanatômica e funcional característica da córnea. A microscopia confocal *in vivo* revelou que o plexo nervoso sub-basal forma um padrão espiralado de fibras nervosas, cujo centro se denomina vórtex e está localizado, no Homem, 2 a 3 milímetros inferior e nasal ao ápex da córnea. As células epiteliais basais e os nervos sub-basais parecem migrar centripetamente de forma associada (Patel et al., 2006), possivelmente em resposta a factores quimiotrópicos,

a estímulos electromagnéticos e/ ou a pressões populacionais celulares, podendo os nervos sub-basais, localizados nos espaços intercelulares entre essas células migratórias, ser arrastados ao longo do trajecto. Uma explicação alternativa seria a de que os nervos sub-basais desenvolvem primariamente a sua orientação em espiral de forma independente da dinâmica das células epiteliais, e sejam na realidade responsáveis pelo molde estrutural que influencia a migração daquelas células (Bee et al., 1986; Nagasaki and Zhao, 2003; Riley et al., 2001).

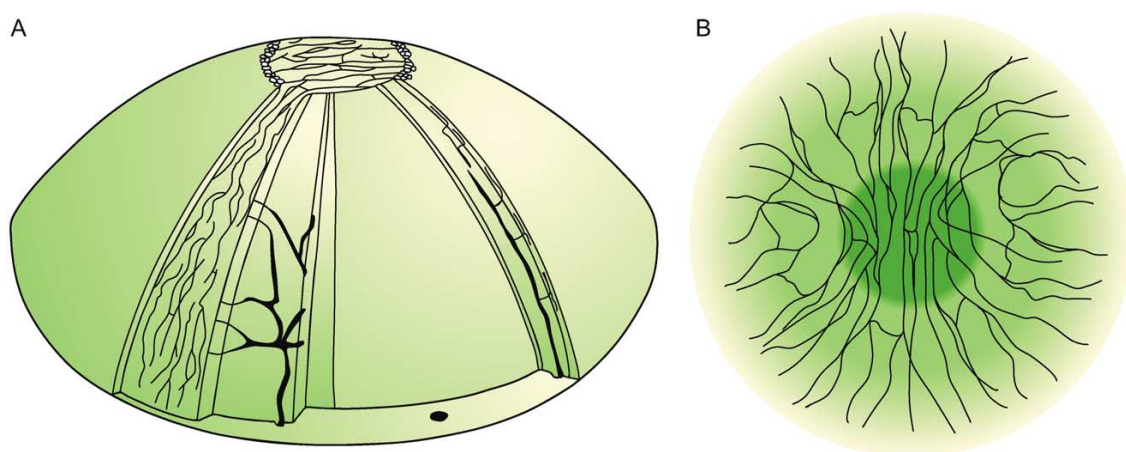


Figura 1 – **(A)** Distribuição esquemática dos nervos sensitivos no estroma e plexo sub-basal em córneas humanas. No ápex corneano as fibras nervosas correm principalmente nas direcções 6 – 12h, 5 – 11h ou 7 – 1h; **(B)** No ápex, os feixes nervosos mostram uma orientação preferencial na direcção superior-inferior e, na área circundante, tendem a ser orientados na direcção nasal-temporal. (*adaptado de Müller et al., 2003*)

As fibras intra-epiteliais acabam como terminações nervosas livres, aparecendo como expansões terminais bulbosas e proeminentes que parecem morfologicamente homogêneas à microscopia óptica e electrónica, embora a marcação imunocitoquímica revele diferenças na expressão de neuropeptídeos e de outros neurotransmissores, sugerindo uma heterogeneidade funcional (Müller et al., 2003). Estes terminais nervosos estão localizados em todas as camadas do epitélio, estendendo-se alguns micrómetros para além da superfície da córnea, podendo, ocasionalmente, ser envolvidas por invaginações das membranas celulares epiteliais (Marfurt et al., 2010). Este contacto íntimo pode facilitar a troca bidireccional de substâncias difusíveis entre ambas as estruturas, além de permitir a detecção pela célula nervosa de mudanças no formato ou volume da célula epitelial, nomeadamente aquelas associadas a desidratação ou edema da superfície ocular.

Os nervos sofrem remodelação na córnea adulta ao longo de toda a vida. Os feixes estromais profundos mantêm uma posição e configuração relativamente constantes dentro da córnea, enquanto o plexo sub-basal, e especialmente as terminações intra-epiteliais, são alvo de rearranjo extenso. A microscopia confocal LASER *in vivo* revela que o plexo nervoso sub-basal da córnea humana é uma estrutura dinâmica com um movimento centrípeto lento mas contínuo (5 a 15 micrómetros por dia, renovando-se a cada 6 semanas) (Patel and McGhee, 2009). É importante referir a este propósito que a microscopia confocal só consegue avaliar morfologicamente os nervos corneanos dos principais troncos nervosos até ao nível do plexo sub-basal, uma vez que a resolução e o contraste dessas imagens não permite a visualização da sub-ramificação adicional nem das terminações nervosas livres (Stachs et al., 2007).

As terminações nervosas intra-epiteliais são sujeitas a contínua remodelação que se supõe depender, por um lado, desta reconfiguração morfofuncional do plexo nervoso sub-basal, mas sobretudo da perda contínua de células epiteliais na superfície ocular. Neste sentido, a reorganização das células epiteliais decorrente da migração contínua até às camadas mais superficiais da córnea induz mudanças na arquitectura das terminações nervosas intra-epiteliais que se verificam em menos de 24 horas (Harris and Purves, 1989), mas cujos mecanismos moleculares estão mal caracterizados. Tal como no desenvolvimento embrionário, sabe-se que os nervos sensitivos corneanos adultos mantêm a capacidade de responder a semaforinas, as quais inibem o crescimento das fibras nervosas, quer em nervos seccionados quer intactos (Tanelian et al., 1997).

Em várias espécies de mamíferos, a densidade dos terminais nervosos da córnea diminui com a idade (Dvorscak and Marfurt, 2008; Erie et al., 2005), constituindo tal facto a explicação mais provável para a redução da sensibilidade corneana verificada nos idosos (Acosta et al., 2006; Bourcier et al., 2005; Millodot, 1977). A sensibilidade da superfície ocular pode ser afectada de forma variável por diferentes processos patológicos (por exemplo, queratite herpética, diabetes, distrofias da córnea, queratocone, patologia da órbita), por procedimentos cirúrgicos (do segmento anterior e posterior), por aplicação tópica de fármacos (ex: anestésicos, anti-inflamatórios não esteróides) e mesmo devido ao uso de lentes de contacto (Kohlhaas, 1998).

Ao contrário da generalidade da patologia do segmento posterior do olho, a dor é um sintoma cardinal dos processos inflamatórios e traumáticos do segmento anterior do olho. O olho seco, condição de etiologia multifactorial (e não raras vezes sistémica) que produz alterações persistentes nos epitélios da superfície ocular, é a causa mais frequente de desconforto ocular

persistente e dor. A sensibilidade específica da córnea constitui assim uma medida clínica útil para aferir a vitalidade do tecido, uma vez que os nervos corneanos contribuem directamente para a renovação do epitélio, além de desempenharem um papel protector enquanto via aferente dos mecanismos reflexos do pestanejo e da secreção lacrimal (Müller et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais os nervos corneanos mantêm a superfície ocular e promovem a cicatrização após lesão ocular são uma área de investigação activa. Sabe-se que estes nervos têm a capacidade de secretar neuropeptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*, CGRP), além de neurotransmissores diversos como a noradrenalina (por nervos simpáticos), a acetilcolina (por nervos parassimpáticos), o polipeptídeo intestinal vasoactivo e a neurotensina, que no seu conjunto se supõe contribuir para a homeostasia e proliferação epitelial da córnea, entre outras funções menos elucidadas (Belmonte et al., 2004a).

Os nervos corneanos adultos mantêm a capacidade de se regenerarem após lesão. Uma vez que a regeneração nervosa ocorre a uma taxa de aproximadamente 1 milímetro por mês, podem ser necessários 3 a 12 meses, ou mais, para que se verifique uma adequada reinervação da córnea e restauração da sensibilidade (Fountain, 2008). Mesmo após regeneração nervosa máxima, a sensibilidade no segmento da córnea envolvido pelo processo patológico ou iatrogénico é geralmente inferior àquela verificada previamente, significando tal a criação de condições potenciais a longo prazo, se não mesmo a curto prazo, para o desenvolvimento de queratopatia neurotrófica. A morfologia e propriedades funcionais dos nervos mudam substancialmente com o processo regenerativo. As terminações nervosas distais ao local da lesão degeneram, sendo que os cotos centrais produzem um padrão nervoso bastante diferente da arquitectura original, num processo que compreende várias fases (Rozsa et al., 1983; Yu and Rosenblatt, 2007). Após secção nervosa, a área desnervada é primariamente invadida por brotos de fibras nervosas adjacentes intactas. Posteriormente, o coto central dos axónios lesionados inicia o processo de regeneração formando microneuromas a partir dos quais surgem brotos secundários que levam à degeneração das projecções primárias oriundas das fibras intactas adjacentes (Rozsa et al., 1983). Uma explicação sugerida para as alterações morfológicas e funcionais nos neurónios em regeneração poderá ser a interrupção da captação, pelos terminais nervosos lesados, de moléculas sinalizadoras como o factor de crescimento nervoso (NGF) produzido pelas células da córnea, os quais são transportadas retrogradamente até ao corpo celular do neurónio onde regulam a expressão génica (Belmonte et al., 2004a; Beuerman and Rózsa, 1984; De Felipe



and Belmonte, 1999). Em particular, verifica-se uma sobre-expressão de canais de sódio e potássio durante a regeneração axonal (Black and Waxman, 2002; Waxman et al., 1999), com consequente perturbação da excitabilidade nervosa e descargas ectópicas (Matzner and Devor, 1994) e aberrantes a estímulos naturais (Rivera et al., 2000). Tal actividade estará na origem da dor neuropática periférica referida à superfície ocular e região peri-ocular (Belmonte et al., 2004b). Em condições experimentais, tais alterações funcionais foram documentadas após axotomia de neurónios corneanos (Gallar et al., 2007), em que se verificou que os nociceptores polimodais e os receptores sensíveis ao frio exibiam maior actividade espontânea durante várias semanas após a lesão original.

A sensibilização dos nociceptores oculares pode também ocorrer pelo efeito de uma grande variedade de mediadores inflamatórios nas terminações nervosas (incluindo: iões como o hidrogénio e o potássio; purinas como a adenosina e o ATP; aminas como a 5-hidroxitriptamina e a histamina; e mediadores neuro-humorais e pro-inflamatórios como o factor activador das plaquetas, a bradicinina, as prostaglandinas, os leucotrienos, o tromboxano, as interleucinas, o factor de necrose tumoral e o supracitado NGF, entre outros), os quais são libertados localmente por células residentes danificadas e por células do sistema imune recrutadas para a área da lesão. Diversos receptores e canais iónicos membranares localizados nas terminações nervosas polimodais são activados por muitos destes mediadores (directamente ou através de diversas vias de transdução do sinal: por exemplo, os receptores da prostaglandina E<sub>2</sub>, ATP, adenosina e 5-hidroxitriptamina activam a via de sinalização da proteína cinase A, enquanto os receptores da bradicinina, activam a proteína cinase C), de que resulta aumento da condutância iónica e da excitabilidade da membrana celular, com consequente redução do limiar e aumento da frequência das despolarizações que caracterizam o processo de sensibilização nervosa (Handwerker, 1991). Neuropeptídeos (como o CGRP e a substância P) e prostaglandinas, libertados pela despolarização das terminações nociceptivas, contribuem com um processo de inflamação “neurogénica” amplificando a resposta inflamatória local (vasodilatação, transudação e migração celular). Este processo afecta tanto a área da lesão como outras regiões intactas mas inervadas por ramos dos nervos afectados, podendo tal explicar a extensão da inflamação a tecidos adjacentes e intactos (como a conjuntiva, a íris ou o corpo ciliar) que normalmente acompanha uma lesão circunscrita à córnea (Belmonte et al., 2004a). Fármacos que impedem a formação ou libertação de mediadores inflamatórios, como os anti-inflamatórios não esteróides (inibidores da síntese de prostaglandinas), não diminuem apenas a inflamação local, mas reduzem também a sensibilização dos nociceptores oculares (Acosta et al., 2007; Chen et al.,

1997). Tal facto contribui para o efeito analgésico exercido por estes fármacos na dor ocular pós-operatória (Acosta et al., 2005; Stein et al., 1994). A sensibilização dos nociceptores desenvolve-se poucos minutos após lesão aguda da córnea e persiste em regra enquanto a inflamação persistir. Desta forma, em processos inflamatórios de longa duração, como no olho seco crónico, ocorrem alterações permanentes na expressão de receptores e canais iónicos ao nível dos corpos celulares e dos terminais periféricos dos nervos sensitivos (Diogenes et al., 2007; Galor et al., 2016, 2015).

Em síntese, a excitabilidade intrínseca anormal (Belmonte et al., 2004a) resultante de lesão traumática ou inflamatória da córnea, permite explicar a permanência a longo prazo destes estados de hiperalgesia (impulsos espontâneos e activação por estímulos normalmente mínimos) e de disestesia/ alodinia (activação paradoxal por estímulos não nódicos), os quais se verificam frequentemente após cirurgia ocular e constituem uma forma de dor neuropática (Belmonte, 2007).

### Sobre a inervação simpática e os adrenoceptores da córnea

Conforme referido, a córnea tem uma das maiores densidades de fibras nervosas em mamíferos e possui dupla inervação, recebendo nervos aferentes do gânglio do trigémeo e nervos eferentes do gânglio cervical superior (Klyce et al., 1985). Estes últimos são nervos simpáticos, cuja função na córnea é ainda bastante ambígua (Ehinger, 1966; Marfurt and Ellis, 1993; Toivanen et al., 1987).

Embora as diversas espécies de mamíferos recebam contribuições variáveis de fibras nervosas corneanas oriundas do sistema nervoso autónomo, as córneas humanas são consideradas no extremo desse espectro, pois parecem ter uma proporção muito pequena de fibras nervosas autonómicas (Müller et al., 2003).

Foi já descrita a presença de NA e AD na córnea e das enzimas responsáveis pela sua biossíntese (Pullar et al., 2007). A córnea expressa também vários tipos de adrenoceptores (Liu et al., 1990; Walkenbach et al., 1991; Yasukura et al., 1995) e foram documentados especificamente adrenoceptores alfa-1 regulando o *turnover* de bifosfato de inositol nas células epiteliais de córneas humanas e de Coelho (Walkenbach et al., 1991)

Foi proposta a existência de um sistema simpático intrínseco da córnea. Em concreto, verificou-se que a proliferação das células epiteliais da córnea é duplamente regulada por uma resposta "off" adrenérgica dependente de AMP cíclico e por uma resposta "on" muscarínica dependente de GMP cíclico (Ghoghawala et al., 2008). Há ainda evidência de que a estimulação adrenérgica nas células epiteliais e endoteliais da córnea leva à activação da proteína cinase A (PKA) por meio da estimulação da adenilciclase (com aumento da síntese de AMP cíclico), e a estimulação de adrenoceptores alfa-2a inibe a actividade da PKA por meio da inibição da adenilciclase (com diminuição da síntese de AMP cíclico) (Grueb et al., 2008). Acredita-se que esta via AMP cíclico–PKA desempenhe um papel relevante em funções corneanas essenciais, nomeadamente na homeostasia de base e na reparação tecidual após lesão. A este propósito, demonstrou-se no Rato que os nervos simpáticos oculares estimulam a proliferação das células epiteliais corneanas, em condições fisiológicas normais e durante a cicatrização de lesões superficiais da córnea, de forma independente das interações funcionais com os nervos sensitivos e associada, pelo menos em parte, à libertação de noradrenalina (Jones and Marfurt, 1996; Müller et al., 2003).

É um facto que a ocorrência de disfunção neuronal geral (somática e autonómica) é uma característica fisiopatológica comum a diferentes doenças oculares (de que os exemplos mais óbvios são a diabetes mellitus ou a paramiloidose), constituindo uma causa importante de cegueira relacionada com a córnea (Müller et al., 2003; Shaheen et al., 2014). No caso específico da inervação simpática, há evidência crescente de que parece desempenhar um papel neurotrófico na córnea, conforme sugerido clinicamente no síndrome de Parry-Romberg (atrofia hemifacial) ou no síndrome de Horner, situações em que a desnervação simpática pode causar descompensação endotelial e edema corneano (Zamir et al., 1999). A tal evidência clínica acresce evidência experimental: trabalhos realizados em ratos submetidos a simpatectomia química demonstraram maior susceptibilidade a infecção da córnea por vírus Herpes tipo 1 (Templeton et al., 2008).

Não obstante, questões como qual a catecolamina mais abundante na córnea ou qual a sua principal fonte endógena (neuronal, local ou hematogénea) permanecem em grande parte sem resposta. Por conseguinte, formulámos as hipóteses de a principal catecolamina e respectiva origem na córnea ser a libertação neuronal de NA a partir de nervos simpáticos intrínsecos, em vez da produção local (não neuronal) ou da origem hematogénea.

## Sobre a queratopatia neurotrófica e a infecção da córnea

Além do seu papel na sinalização de estímulos externos ou internos, os nervos oculares desempenham um papel trófico importante na manutenção da integridade e no crescimento dos tecidos por eles innervados. Este efeito é particularmente evidente na córnea.

O compromisso da inervação sensitiva da córnea origina queratopatia neurotrófica, caracterizada por uma série de distúrbios funcionais que têm como consequência o desenvolvimento de defeitos epiteliais e úlceras recorrentes. Processos locais ou sistêmicos que afectem os nervos corneanos perturbam a capacidade de regeneração celular (Bonini et al., 2003; Liesegang, 1999; Tervo and Moilanen, 2003) e a permeabilidade epitelial (Beuerman and Schimmelpfennig, 1980), de que resulta cicatrização incompleta de úlceras da córnea e redução da transparência do tecido. A este propósito cite-se a utilização de lentes de contacto como exemplo de um processo local, e a neuropatia somática e autonómica associada à diabetes mellitus como exemplo de um processo sistémico.

Conforme referido previamente, os nervos sensitivos da córnea libertam neuropeptídeos essenciais à manutenção da integridade do epitélio corneano e à cicatrização de lesões (Garcia-Hirschfeld et al., 1994; Imanishi et al., 2000; Lambiase et al., 2000). Por outro lado, os tecidos não-neuronais produzem diversos factores de crescimento necessários ao desenvolvimento, remodelação e regeneração dos nervos corneanos. São exemplos o factor neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o factor de crescimento opióide (OGF), o factor neurotrófico ciliar (CNTF), o factor derivado do epitélio pigmentado (PEDF), o factor de crescimento nervoso (NGF) e as neurotrofinas 3 e 4 (NT-3, NT-4), os quais parecem contribuir activamente para a manutenção da inervação da córnea (Bonini et al., 2003; Kruse and Tseng, 1993; You et al., 2000).

A queratite infecciosa é uma das mais importantes causas de morbilidade ocular e pode resultar em perda visual grave, representando uma das causas mais comuns de cegueira corneana (Collier et al., 2014; Lichtinger et al., 2012), podendo ser diagnosticada em todas as faixas etárias (Keay et al., 2006; Lam et al., 2002). Os microrganismos envolvidos geralmente dependem da existência de factores de risco predisponentes em cada indivíduo (Ng et al., 2015).

A selecção de antibioterapia empírica é frequentemente baseada no perfil demográfico do paciente e na identificação de factores de risco, sendo em regra iniciada antes da identificação dos agentes causais e dos resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos estarem disponíveis (Baum, 1979; Jones, 1979). Citando um exemplo, o uso de lentes de contacto é um dos principais factores de risco para queratite bacteriana e amebiana (Collier et al., 2014; Keay et al., 2006). Existem todavia variações temporais e regionais na prevalência dos diferentes microrganismos, as quais reflectem a heterogeneidade das diversas populações humanas e efeitos ambientais diversos, nomeadamente climáticos (Lam et al., 2002; Lichtinger et al., 2012).

Por outro lado, o uso generalizado de antibióticos de largo espectro tem produzido uma alteração correspondente no espectro bacteriano e na respectiva sensibilidade aos fármacos etiotrópicos, nomeadamente com a emergência gradual de fenótipos de resistência (Alexandrakis et al., 2000; Ray et al., 2013; Zhang et al., 2008). Portanto, a identificação dos principais factores de risco oculares e sistémicos é essencial para fornecer orientações baseadas em evidência científica e desta forma garantir uma abordagem empírica racional da queratite infecciosa.

## OBJECTIVOS

Definimos como objectivos principais desta investigação os seguintes:

- Caracterização clínica dos principais factores de risco locais e sistémicos para infecção da córnea, com destaque para aqueles associados a perturbação da inervação corneana
- Criação de um modelo experimental de córnea em animal de experiência (Coelho), com adequada reprodutibilidade no Homem, para estudo dos mecanismos adrenérgicos e da inervação simpática
- Determinação da principal origem de noradrenalina (neuronal ou não-neuronal) na córnea de Coelho e na córnea humana

- Caracterização da regulação pré-juncional da libertação de noradrenalina na córnea, nomeadamente a presença e actividade dos adrenoceptores alfa-2 pré-sinápticos
- Caracterização morfológica da inervação simpática na córnea e definição da sua relevância funcional
- Estabelecimento da importância relativa das contribuições do sistema nervoso simpático e dos mecanismos adrenérgicos locais na córnea

## IV. PUBLICAÇÕES





Clinical and Microbiological Profile of Bacterial Microbial Keratitis in a  
Portuguese Tertiary Referral Center—Where Are We in 2015?



# Clinical and Microbiological Profile of Bacterial Microbial Keratitis in a Portuguese Tertiary Referral Center—Where Are We in 2015?

Carla Sofia Ferreira, M.D., Luis Figueira, M.D., Nuno Moreira-Gonçalves, M.D., Raúl Moreira, M.D., Luis Torráo, M.D., and Fernando Falcão-Reis, Ph.D.

**Objectives:** To study the microbial profile, antibiotic susceptibility pattern, risk factors, therapeutic trends, and clinical outcomes for microbial keratitis (MK) in a tertiary health care center.

**Methods:** All cases with suspected bacterial keratitis that were followed at consultation from September 2007 to August 2015 were included. Microbial cultures were obtained and patients were managed following an internal protocol.

**Results:** Two hundred thirty-five patients were included, with a mean age of  $50.01 \pm 20.73$  years. We obtained a 38.4% culture-positive rate, with higher proportion of gram-positives (70.8%). The commonest agents were *Staphylococcus aureus* (23.1%), *Corynebacterium macginleyi* (20.0%), and *Pseudomonas aeruginosa* (13.8%). Fluoroquinolone susceptibility was 97%, with no trend toward its decrease. A total of 95.7% had local risk factors, being trauma and contact lens wear the most common (28.9% each), with different age and pathogens distributions ( $P < 0.001$ ). Topical fluoroquinolones were first-line treatment in 99%, in association with aminoglycosides in 81.6%. Good initial response was registered in 95.9%, but 4.1% needed to step up treatment to fortified antibiotics, mainly if *Pseudomonas* ( $P = 0.021$ ). Good outcome was achieved in 81.8%, negatively affected by exposure and herpetic keratitis ( $P < 0.001$ ), central location ( $P = 0.01$ ), presence of Tyndall ( $P < 0.001$ ), corneal edema ( $P < 0.001$ ), and worse initial best-corrected visual acuity ( $P < 0.001$ ), but not *Pseudomonas* isolate ( $P = 0.724$ ).

**Conclusions:** Gram-positives are the most frequent pathogens and shifting trends in the isolate distribution or emergence of resistant strains were not demonstrated. The susceptibility to first-line antibiotic agents remained high. We suggest a more aggressive approach to *P. aeruginosa* cases or MK presenting with poor outcome variables.

**Key Words:** Microbial keratitis—Corneal ulcers—Antibiotics—Microbiology—Risk factors.

(*Eye & Contact Lens* 2016;00: 1–6)

Microbial keratitis (MK) is an important cause of ocular morbidity and can result in severe visual loss, representing one of the commonest causes of corneal blindness.<sup>1–3</sup>

From the Department of Ophthalmology (C.S.F., L.F., N.M.-G., R.M., L.T., F.F.-R.), Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal; Department of Pharmacology and Therapeutics (L.F.), Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal; and Department of Sense Organs (L.T., F.F.-R.), Faculty of Medicine of University of Porto, Porto, Portugal.

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

Address correspondence to Carla Sofia Ferreira, M.D., Alameda Prof. Hernâni Monteiro, Porto 4200-319, Portugal; e-mail: Carla.sss.ferreira@gmail.com

Accepted May 10, 2016.

DOI: 10.1097/ICL.0000000000000298

Contact lens wear (CLW) is one of the major risk factors for MK,<sup>1,4</sup> but it may be diagnosed in patients of all age groups and other important factors may be involved as well.<sup>4,5</sup> Causative agents usually have a relation with the predisposing factors that are present for each individual.<sup>3</sup>

Usually, broad-spectrum, intensive therapy with a combination of antimicrobial agents must be decided before causative organisms can be identified and susceptibility results are available.<sup>6</sup> This decision is often based on patient's demographics, risk factor profile, and microbial isolates pattern.<sup>3</sup> There are temporal and regional variations in the predominance of different microbes, reflecting different patient populations and climatic effects,<sup>2,5</sup> so that local epidemiological studies become necessary.<sup>7</sup>

With widespread use of broad-spectrum antibiotics, a corresponding change in the microbial spectrum and their sensitivities to antibiotics occurred. Again, reports for emergence of resistance in the past decade show a wide variability.<sup>8–10</sup> Therefore, knowledge of local epidemiology is necessary to provide evidence-based guidance for the successful empirical management of bacterial keratitis in a cost-effective approach.

So, in this study, we aimed to investigate the microbiological and antibiotic susceptibility pattern, to characterize ocular and systemic risk factors contributing to MK, therapeutic trends and clinical outcome in a Portuguese tertiary referral center, for the cases of suspected bacterial keratitis, during the last eight years.

## METHODS

This retrospective study included all patients with corneal ulceration and presumed bacterial etiology, diagnosed, and then followed in Hospital São João, Porto, Portugal, from September 2007 to August 2015. The study complied with the Declaration of Helsinki and Institutional Review Board approval has been obtained.

Microbial keratitis was defined by either a positive corneal culture or a corneal infiltrate and overlying epithelial defect plus one or more of the following: any part of the lesion within the central 4 mm of the cornea, an anterior chamber response, or pain.<sup>11,12</sup>

All patients were managed following an internal protocol created by the authors, modified in 2013. Briefly, two swabs were obtained for each patient, under topical anesthesia, from conjunctival fornix and ulcer base; they were inoculated onto Amies Agar Gel (Copan, Brescia, Italy) and sent to the Department of Microbiology for culture and antibiotic susceptibility testing. Any positive growths

from the specimens would be reported by the microbiologist. If the patient was a CLW, the contact lens (CL) and/or case (when available) were also sent to microbiology.

The patients were empirically medicated with a third or fourth-generation fluoroquinolone hourly, often with another antibiotic association and support treatment, as clinically depicted. In severe cases, failure of a good response to antibiotics in 24 to 72 hr (extensive corneal involvement, aggressive anterior chamber reaction and pain progression) was hospitalized to be started on fortified antibiotics.

The study was therefore divided into 2 periods for analysis: 2007 to 2013 and 2013 to 2015. Microbial characteristics are described for both, but clinical and therapeutic characteristics are only reported for the last period, because of different observers and protocols in use.

Data collection from serial consultation included patient demographics, local, and systemic risk factors, clinical features as size/location/anterior chamber reaction and the clinical outcomes.

Three hundred twelve processes were initially reviewed. Cases who lost follow-up (2 cases) were excluded from analysis. Also, cases presenting as perforation (11 cases) or sent by other hospitals (17 cases) are not part of the study. Fungal, viral, or *Acanthamoeba* etiology (47 cases) are out of the scope of this article, thus cases in which they were isolated, were also excluded from this analysis.

Besides MK, other two important definitions in our study are "Size of lesion," which was categorized as large if  $\geq 3$  mm largest infiltrate diameter, otherwise as small; "Poor outcome" if the Snellen best-corrected visual acuity (BCVA) at final consultation was  $<0.8$  (or dropped as compared with initial BCVA, in cases there where preexisting ocular pathology) or if a major complication occurred, which included corneal perforation, endophthalmitis, or need of keratoplasty.<sup>3</sup>

Statistical analysis was performed using SPSS software, version 20 (IBM, Chicago, IL). To describe the sample, the mean and SDs were used for continuous variables and rates and percentages for

categorical ones. The Spearman rank correlation coefficient was used to test for trends. To compare differences between groups, chi-square test, *t* test, logistic, and multiple regression were performed, as appropriated.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

A total of 235 patients were included in this study. Mean age was  $50.01 \pm 20.73$  years, with a range of 10 to 90 years old; cases were not evenly distributed ( $P < 0.001$ ), being the peak incidence between the 21 and the 60 years (150 cases representing 63.8% of all), as showed in Figure 1. Sex distribution was 44.9% males and 55.1% females.

We analyze 235 cases (2007–2015) for risk factors and microbiology and 98 cases (2013–2015) for clinical and therapeutics variables. Two patients were lost to follow-up.

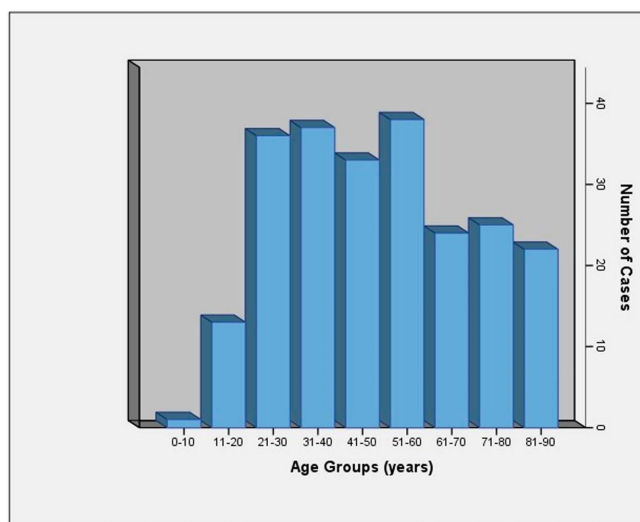
### Microbiology

In 52 (22.1%) cases, the initial physician did not performed the swabs in the emergency department; in the period studied, there was a shifting trend to perform more microbiological cultures ( $P = 0.027$ ;  $r = 0.148$ ). In the remaining, 38.4% were positive—for both swabs in 29 (49.2%), just for ulcer base in 16 (27.1%) and fornix in 12 (20.3%) cases; CL was the only one positive in the two cases that it was sent (3.4%).

Five cases (8%) were reported by microbiology department to be "non-valuable" and in the remaining the most common group of isolates were the gram-positives, which accounted for 70.8% of cases. The commonest individual agents were *S. aureus* (23.1%), *C. macginleyi* (20.0%), and *P. aeruginosa* (13.8%). For six cases, growth was polymicrobial. The distribution of microbial isolates is shown in Table 1.

The proportion of gram-positive and gram-negative isolates, as illustrated in Figure 2, did not change over the analysis period ( $P = 0.652$ ).

FIG. 1. Distribution of sample by age groups.



**TABLE 1.** Distribution of microbial Isolates

Agent Isolated	N (%)
Gram-positive	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7 (10.8)
<i>Streptococcus viridans</i>	1 (1.5)
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	1 (1.5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 (23.1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3 (4.6)
Other coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	3 (4.6)
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	13 (20.0)
<i>Kocuria rosea</i>	1 (1.5)
<i>Kocuria kristinae</i>	1 (1.5)
<i>Propionibacterium acnes</i>	1 (1.5)
	46 (70.8)
Gram-negative	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 (13.8)
<i>Serratia liquefaciens</i>	3 (4.6)
<i>Serratia marcescens</i>	3 (4.6)
<i>Morganella morganii</i>	2 (3.0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (3.0)
	19 (29.2)

Sensitivity testing was not performed for *C. macginleyi* and *Propionibacterium acnes*, as the laboratory did not considered it adequate, being deemed as contaminants. Fluoroquinolone susceptibility was tested in all other isolates with 97% susceptibility. The resistances found were in a *P. aeruginosa* strain in 2009 (ciprofloxacin and levofloxacin) and in one *S. aureus* strain isolated in 2015, found to be resistant to all fluoroquinolones and penicillin. Aminoglycoside susceptibility was also tested except for *Streptococcus* sp., with 100% susceptibility—tobramycin had intermediate susceptibility in one *Serratia marcescens* strain isolated in 2010.

*P. aeruginosa* were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole in 44.4%, but were otherwise susceptible to antibiotics tested. Other gram-negatives had a common pattern of resistances: cefuroxime, amoxicillin, ampicillin in 100%, and nitrofurantoin in 60%. Gram-positives were susceptible to all antibiotics tested, except for *Staphylococcus epidermidis*, which showed a distinctive pattern of

100% resistance to penicillin and fusidic acid, 66% to tetracycline and 33% for erythromycin.

### Risk Factors

We found at least 1 identifiable ophthalmologic risk factor in 225 patients (95.7%), being multiple factors present for 51 cases (22%) and 1 factor for 174 cases (74%). Additional systemic factors were present for 27.6%. Trauma and CLW were the most common, each accounting for 28.9% of cases. The distribution of the risk factors is demonstrated in Table 2.

Among the 65 CLW, 40 (60.5%) cases occurred in monthly replacement schedules, 14 (21.1%) in daily replacement, 5 (7.9%) in biweekly, 3 (5.3%) annual replacement, and 3 (5.3%) occurred in rigid permeable gas lenses.

Age distribution was different according to the risk factors, and as depicted in Table 2, the CLW were significantly younger (mean 36 years old,  $P<0.001$ ) than the other.

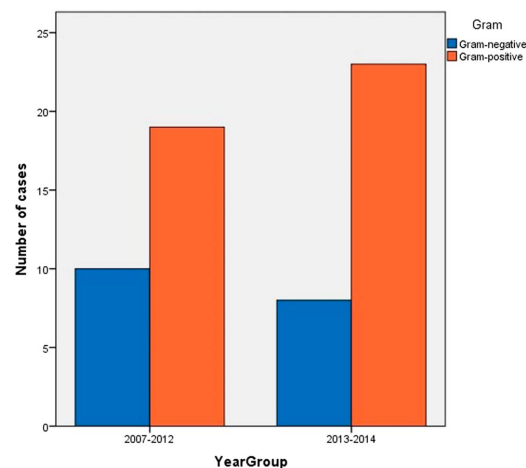
Also, microbial features were different according to the risk factors present—when compared with non-CL-related cases, CL-related keratitis grew a statistically significant higher proportion of gram-negative bacteria ( $P<0.001$ ), and *P. aeruginosa* accounted for more 36.3% of the cultured bacteria, followed by *Serratia* sp. (18%) and *S. epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* (13.6%). Instead, for trauma, the main isolates were *C. macginleyi* (35.3%), *S. aureus* (29.4%), and *Streptococcus pneumoniae* (29.4%).

No systemic risk factors changed proportions of isolates ( $P=0.143$ ).

### Clinical Presentation

There was no statistical difference in monthly distribution of cases ( $P=0.574$ ). A total of 51% of cases occurred in the right eye and 49% in the left eye. Mean initial Snellen BCVA was  $0.47\pm0.35$ .

The preferred locations for MK were at the inferior periphery (24 cases, 24.5%), at the inferior paracentral area (22 cases, 22.4%),



**FIG. 2.** Proportion of gram-positive and gram-negative isolates in the two periods studied. ( $P=0.652$ ).

**TABLE 2.** Distribution of microbial Isolates

Risk Factors	N (%)	Age, yrs
Local		
None	8 (3.6)	54,38±19,813
Ocular trauma	65 (28.9)	54,20±16,919
Contact lens use <sup>a</sup>	65 (28.9)	36,53±16,757
Blepharitis	13 (5.8)	53,15±21,357
Trichiasis	5 (2.2)	77,80±16,239
Bullous/band keratopathy	11 (4.9)	64,64±16,919
Dry eye	14 (6.2)	64,36±16,341
Recurrent erosion	9 (4.0)	55,00±15,190
Ocular infection	19 (8.4)	47,11±23,383
Herpetic keratitis history	3 (1.3)	52,00±26,851
Exposure keratopathy	13 (5.8)	56,08±22,403
	225 (95.7)	
Systemic		
Diabetes mellitus	27 (13.0)	59,36±14,341
Neoplasia	4 (1.9)	67,11±15,433
Autoimmune disease under immunosuppressant	5 (2.4)	46,11±16,310
Mucocutaneous disease	10 (4.8)	55,11±23,423
Poor systemic status/multiple co-morbidities	12 (5.8)	75,80±16,449
HIV	2 (1.0)	45,56±11,383
Drugs	2 (1.0)	47,18±18,769
	62 (27.6)	

<sup>a</sup>Statistical difference ( $P<0.001$ ); age expressed as mean±SD.

and central (20 cases, 20.4%). In most of the cases (77.6%), lesion diameter was inferior to 3 mm. Anterior chamber reaction was present in 24.5% and hypopyon was noted for 11.2%. Corneal edema was present for 33.7%.

*P. aeruginosa* was significantly associated with a worse presentation: presence of Tyndall (100% in *Pseudomonas* versus 25% in non-*Pseudomonas*,  $P=0.007$ ), hypopyon (75% vs. 14.3%,  $P=0.018$ ), corneal edema (100% vs. 40.6%,  $P=0.04$ ), bigger lesion ( $\geq 3$  mm in 100% vs. 18.8%,  $P=0.004$ ; Pearson correlation  $r=0.580$ ,  $P<0.001$ ), and worse initial BCVA ( $P=0.025$ ;  $r=0.408$ ). Preference for central location did not achieve statistical significance (100% vs. 50%,  $P=0.113$ ). Final BCVA was not affected by this agent ( $P=0.877$ ).

### Therapeutics

Topical fluoroquinolones were started as first-line treatment in 99% of cases—46.9% ciprofloxacin, 26.5% moxifloxacin, 17.3% levofloxacin, and 8.2% ofloxacin. In 81.6% of these cases, fluoroquinolones were combined with aminoglycosides (91.3% tobramycin, 8.7% gentamicin). Antifungal agent clotrimoxazole on top of initial antibacterial treatment was added in 13.3%. A combination of fortified antibiotics (ceftazidime plus gentamicin plus fluconazole) was used as first line in 1 case (1%) of *P. aeruginosa*.

Good initial response was registered in 95.9%, with improvement in pain, epithelial defect/infiltrate size, or amount of hypopyon; 4 cases (4.1%) needed to step up treatment to fortified antibiotics because of lack of response to standard treatment after 48 to 72 hr, especially if *Pseudomonas* was identified ( $P=0.021$ ).

Topical corticosteroids were later associated in 75.5% patients.

### Clinical Outcomes

A mean of  $5.06 \pm 3.62$  consultations were performed to each patient, along a mean of  $6.35 \pm 6.76$  weeks to discharge.

Mean initial BCVA of  $0.47 \pm 0.35$  significantly improved to  $0.69 \pm 0.37$  in the final consultation ( $P<0.001$ ). Good outcome was achieved in 81.8%, but 18.2% were classified as having a poor outcome; penetrating keratoplasty was performed in 5 cases (1 perforation, 1 descemetocoele, 1 persistent epithelial defect, and 2 leucomas); no endophthalmitis cases were recorded.

Clinical outcome was affected by some factors local risk factors and clinical variables on presentation—achieving a bad outcome, as previously defined, was more common if patient had a background of exposure or herpetic keratitis, ulcer with central location, presence of anterior chamber reaction, corneal edema, and worse initial BCVA, as the results of logistic regression are depicted in Table 3. When multiple regression is performed, the most important clinical variables predicting outcome are presence of Tyndall (beta  $-0.607$ ,  $r^2=0.079$ ), ophthalmologic risk factors (beta  $0.327$ ,  $r^2=0.016$ ), and worse initial BCVA (beta  $0.259$ ,  $r^2=0.064$ ), having the whole model  $r^2=0.508$ .

### DISCUSSION

Literature shows regional variation on microbial and clinical patterns, with changing trends for epidemiology and treatment of bacterial MK.<sup>2,3,5</sup> Particular attention should be given to prompt empirical treatment, because this condition can progress very rapidly, before it can be guided by personal microbiological data, and it can be hampered by the emergence of drug resistance.<sup>6</sup> So,

**TABLE 3.** Logistic Regression results for Risk Factors, Presenting Features and Isolates Testes to Influence the Clinical Outcome

Variables	P
Higher age (mean)	0.089
Presence of any systemic risk factor	0.068
Local risk factors <sup>a</sup>	<b>&lt;0.001</b>
Noncontact lens wearer	<b>0.01</b>
Size $\geq 3$ mm	0.219
Central/paracentral location	<b>0.01</b>
Presence of tyndall	<b>&lt;0.001</b>
Presence of hypopyon	0.143
Corneal edema	<b>&lt;0.001</b>
Worse initial BCVA (mean)	<b>&lt;0.001</b>
Positive isolate	0.655
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolated	0.724

<sup>a</sup>Exposure keratitis and history of herpetic keratitis (Bonferroni adjustment).

Variables associated with poor outcome are bolded in the second column.

knowledge of local epidemiology is mandatory—in this study, we take a current perspective on diagnostic and microbial features, as well as treatment and outcome of bacterial MK in a Portuguese tertiary referral center.

The overall positive culture rate obtained was 38.4%, which is comparable to other series in the past decade, although in the lower yield range (it ranged from 14.1%<sup>10</sup> to 68%,<sup>13</sup> being intermediate values quite variable: 32.3%,<sup>3</sup> 34.2%,<sup>14</sup> 41.8%,<sup>15</sup> 57.4%,<sup>2</sup> and 65.6%<sup>16</sup>). Some patients were already under topical antibiotics when swabs were performed in the emergency department, and it possibly may have lowered the rate.

In our sample, most of the isolates (70.8%) were gram-positive, as in most other from developed countries—in some studies this proportion was even higher (78.2%–83%)<sup>13,16</sup> but values as low as 38.9% have been reported.<sup>14</sup> A Toronto series, from 2012 showed a rate of 76.3% gram-positives, but with a decreasing trend, which might be related to the rise in CLW.2 In fact, recent studies in developed Asia also showed intermediate proportions (50%–57.6%).<sup>3,15</sup> However, we could not demonstrate any change in the proportion of gram-positive and gram-negative isolates over the analysis period.

Our commonest agents were *S. aureus* (23.1%) and *C. macginleyi* (20.0%). In the literature, *P. aeruginosa* and coagulase-negative *Staphylococcus*, our third and fourth agents, are usually the major ones.<sup>2,3,13,14,16</sup> However, our *S. aureus* is also a major pathogen in several studies.<sup>2,3,7,14</sup> *C. macginleyi* seem to participate actively in the physiopathology of blepharitis, as *S. epidermidis* and *S. aureus*,<sup>17</sup> and its clinical importance as a potential cause of superinfections has been recognized,<sup>18</sup> but besides our series, just another one points it as a common causative agent.<sup>10</sup>

Bacterial MK is rare in the absence of predisposing factors<sup>7</sup> and risk factors are well connected to pathogens distribution in each region. The widespread use of CLs has dramatically increased the incidence of CL-related MK.<sup>13,19</sup> Indeed, in our sample, it was the main predisposing factor, as well as trauma (28.9% each), and followed as expected by ocular surface disease.<sup>20</sup> In our CLW subgroup and some other studies,<sup>3,5</sup> *Pseudomonas* was the most common pathogen, followed by other gram-negatives and coagulase-negative *Staphylococcus*, whereas for trauma gram-positives predominated.

Our fluoroquinolone and aminoglycoside susceptibilities were high (97% and 100%, respectively), because it was found in several other series.<sup>2,3,5,14,16</sup> However, higher values of resistance to these antibiotics have been reported: 1% to 15% and 13% to 22%, respectively, in Switzerland<sup>19</sup>; in China, alarming values of 19% resistance to levofloxacin,<sup>15</sup> 35.9% to ciprofloxacin (as high as 50% for *Staphylococcus* sp.), or 29.4% to tobramycin (ascending to 74% in *Streptococcus* sp.)<sup>10</sup> have been reported. The most commonly prescribed topical antibiotics in our primary care setting was chloramphenicol instead of fluoroquinolones, which are mainly prescribed by ophthalmologists, that is probably why naive MK patients showed low resistance rates. Disparity among sensitivities test results around the world is wide, but given the resistance patterns of the organisms encountered in our sample, it seems appropriate to start patients with a suspected bacterial MK on fluoroquinolone therapy while awaiting culture, and aminoglycosides may be a good option to associate. A meta-analysis also supported the use of fluoroquinolone as the first choice to be prescribed as empirical treatment in most cases, as they were at least as effective as combined fortified antibiotics and better tolerated.<sup>21</sup> Despite second- and third-generation fluoroquinolones being considered less appropriate in infections by gram-positive bacteria, due to emerging resistance,<sup>8</sup> clinical practice has not revealed a poor response to topical quinolones, and we found no more resistances than to the fourth generation; also, it was demonstrated that they can achieve extremely high tissue and aqueous levels and be as good as moxifloxacin, with no difference in healing rate, cure rate, or complications.<sup>22</sup> In fact, one review noticed that these quinolones are also good in most cases of gram-positive MK, because in vitro resistance does not necessarily translate to poor efficacy in vivo, due to high local tissue concentrations achieved.<sup>23</sup> Another interesting fact is that the fourth generation quinolones do not have the same potency against *P. aeruginosa*<sup>23</sup>—in our protocol, if the patient is a CLW, the fluoroquinolone we choose to start as first line is ciprofloxacin.

Sensitivity testing was not performed for *C. macginleyi* and *P. acnes*, because the laboratory did not consider it adequate (because of being deemed as contaminants), but while in the first reports *C. macginleyi* was uniformly susceptible to topical antibiotics commonly used in ophthalmology,<sup>24</sup> now high levels of resistance to fluoroquinolones,<sup>25</sup> as well as other antibiotics<sup>26</sup> were already reported. So, we can suggest that this agent has the potential to be pathogenic and highly destructive, particularly if some risk factors are present and that antibiotic susceptibility test would aid in difficult cases.<sup>27</sup>

Topical corticosteroids were later associated in 75.5% patients, as a significant effect of corticosteroids was observed in patients with worse baseline BCVA and central ulcer location, with no safety concerns with adjunctive corticosteroid therapy for bacterial MK.<sup>28</sup>

There was a predominance of small lesions (77.6%), of inferior localizations (46.9%) with an absence of anterior chamber inflammation (75.5%), as typical.<sup>13</sup> Also, *P. aeruginosa* was significantly associated with a worse presentation,<sup>13</sup> probably due to its higher pathogenicity,<sup>29</sup> which also contributed to a higher rate of need to use fortified antibiotics, even in the absence of resistance. However, after adequate treatment, final BCVA was not affected by this agent and the outcome was not worse.

As in other series,<sup>7,13</sup> most bacterial MK resolved favorably (81.8%); literature says that people with bacterial keratitis experienced marked improvement in visual acuity in the first 3 months after starting treatment, and then a smaller but still significant improvement till 12 months.<sup>30</sup> However, some factors may change the good prognosis. Indeed, exposure or neurotrophic keratopathy associated with previous herpetic ocular infection may contribute to slow down and eventually hamper the healing process. Also, ulcers centrally located that progress later to leucoma formation invariably cause loss of vision. At presentation, the presence of anterior chamber reaction, corneal edema, and worse initial BCVA allow us to anticipate a severe infection, with worse final outcome; the organism isolated is not the direct responsible for this, but probably interaction of bacterial pathogenic mechanisms with host defenses.

The main limitations we faced were the retrospective nature of the study, performed in a tertiary referral center, therefore treating a higher portion of patients who did not respond promptly to treatment. This treatment occurred in some patients who have picked up chloramphenicol, fusidic acid, or other antibiotics from pharmacy, but some patients who have been previously treated in other hospitals or clinics were also included, thereby lowering our rate of positive cultures and selecting the worst and resistant cases. Another limitation was that some physicians did not perform microbial swabs in the diagnosis because of smaller lesions and apparently benign nature, or topical antibiotics already instituted before referral, resulting in underreporting of some species. Differences in microbial isolates according to geographic location, referral patterns, extent of empiric antimicrobial therapy before cultures, or other factors may account for the differences seen between our study and other investigators.

This study is the largest performed in the Iberian Peninsula, identifying the most common agents and risk factors. The susceptibility to first-line antibiotic agents remained high and no emergence of resistance was apparent throughout the study's eight-year period, so monotherapy with fluoroquinolones or in association with aminoglycosides was an effective first-line treatment in most of our cases. Despite the susceptibility profile, *P. aeruginosa* MK may need fortified antibiotics in a substantial number of cases. Because of poor outcome, we would suggest more aggressive approach to MK evolving from exposure or herpetic keratitis, in a central corneal location, accompanied by anterior chamber reaction, corneal edema, or low initial BCVA.

## REFERENCES

- Collier SA, Gronostaj MP, MacGurn AK, et al. Estimated burden of keratitis—United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63:1027–1030.
- Lichtinger A, Yeung SN, Kim P, et al. Shifting trends in bacterial keratitis in Toronto: an 11-year review. *Ophthalmology* 2012;119:1785–1790.
- Ng AL, To KK, Choi CC, et al. Predisposing factors, microbial characteristics, and clinical outcome of microbial keratitis in a tertiary centre in Hong Kong: a 10-year experience. *J Ophthalmol* 2015;2015:769436.
- Keay L, Edwards K, Naduvilath T, et al. Microbial keratitis predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology* 2006;113:109–116.
- Lam DS, Houang E, Fan DS, et al. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. *Eye (Lond)* 2002;16:608–618.
- Baum JL. Initial therapy of suspected microbial corneal ulcers. I. Broad antibiotic therapy based on prevalence of organisms. *Surv Ophthalmol* 1979;24:97–105.

7. Figueira L, Torão L, Fonseca S, et al. Epidemiologia das úlceras da córnea— a experiência do Hospital de S. João. *Acta Ophthalmologica* 2009;18/19:17–29.
8. Alexandrakis G, Alfonso EC, Miller D. Shifting trends in bacterial keratitis in south Florida and emerging resistance to fluoroquinolones. *Ophthalmology* 2000;107:1497–1502.
9. Ray KJ, Prajna L, Srinivasan M, et al. Fluoroquinolone treatment and susceptibility of isolates from bacterial keratitis. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:310–313.
10. Zhang C, Liang Y, Deng S, et al. Distribution of bacterial keratitis and emerging resistance to antibiotics in China from 2001 to 2004. *Clin Ophthalmol* 2008;2:575–579.
11. Dart JK, Radford CF, Minassian D, et al. Risk factors for microbial keratitis with contemporary contact lenses: a case-control study. *Ophthalmology* 2008;115:1647–1654, 54.e1–3.
12. Stapleton F, Keay L, Edwards K, et al. The incidence of contact lens-related microbial keratitis in Australia. *Ophthalmology* 2008;115:1655–1662.
13. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, et al. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol* 2003;87:834–838.
14. Shalchi Z, Gurbaxani A, Baker M, et al. Antibiotic resistance in microbial keratitis: ten-year experience of corneal scrapes in the United Kingdom. *Ophthalmology* 2011;118:2161–2165.
15. Hong J, Xu J, Hua J, et al. Bacterial keratitis in Shanghai. *Ophthalmology* 2013;120:647.
16. Pandita A, Murphy C. Microbial keratitis in Waikato, New Zealand. *Clin Exp Ophthalmol* 2011;39:393–397.
17. Bezza Benkaouha I, Le Brun C, Pisella PJ, et al. Bacterial flora in blepharitis [in French]. *J Fr Ophthalmol* 2015;38:723–728.
18. Ruoff KL, Toutain-Kidd CM, Srinivasan M, et al. *Corynebacterium macginleyi* isolated from a corneal ulcer. *Infect Dis Rep* 2010;2.
19. Schaefer S, Bruttin O, Zografos L, et al. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol* 2001;85:842–847.
20. Keay L, Edwards K, Naduvilath T, et al. Microbial keratitis. *Ophthalmology* 2006;113:109–116.
21. Hanet MS, Jamart J, Chaves AP. Fluoroquinolones or fortified antibiotics for treating bacterial keratitis: systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Can J Ophthalmol* 2012;47:493–499.
22. Constantinou M, Daniell M, Snibson GR, et al. Clinical efficacy of moxifloxacin in the treatment of bacterial keratitis. *Ophthalmology* 2007;114:1622–1629.
23. Daniell M. Overview: initial antimicrobial therapy for microbial keratitis. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1172–1174.
24. Jousen AM, Funke G, Jousen F, et al. *Corynebacterium macginleyi*: a conjunctiva specific pathogen. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1420–1422.
25. Eguchi H, Kuwahara T, Miyamoto T, et al. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J Clin Microbiol* 2008;46:527–532.
26. Alsuwaidi AR, Wiebe D, Burdz T, et al. *Corynebacterium macginleyi* conjunctivitis in Canada. *J Clin Microbiol* 2010;48:3788–3790.
27. Ferreira CS, Figueira L, Moreira-Gonçalves N, et al. *Corynebacterium Macginleyi* in Corneal Ulcers—Pathogen or Contaminant? London, United Kingdom, 5th Eucornea, 2014.
28. Srinivasan M, Mascarenhas J, Rajaraman R, et al. Corticosteroids for bacterial keratitis: the Steroids for corneal ulcers trial (SCUT). *Arch Ophthalmol* 2012;130:143–150.
29. Al-Mujaini A, Al-Kharusi N, Thakral A, et al. Bacterial keratitis: perspective on epidemiology, Clinico-Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2009;9:184–195.
30. Srinivasan M, Mascarenhas J, Rajaraman R, et al. Visual Recovery in treated bacterial keratitis. *Ophthalmology* 2014;121:1310–1311.e3.



*Beauveria bassiana* Keratitis in Bullous Keratopathy: Antifungal Sensitivity  
Testing and Management



## CASE REPORT

# *Beauveria bassiana* keratitis in bullous keratopathy: antifungal sensitivity testing and management

Luís Figueira<sup>1,2</sup>, Dolores Pinheiro<sup>3</sup>, Raul Moreira<sup>1</sup>, Eugénia Pinto<sup>4</sup>, Joana Simões<sup>3</sup>, Elisa Camisa<sup>1</sup>, Luís Torrão<sup>1</sup>, Jorge Palmares<sup>1</sup>, Fernando Falcão-Reis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ophthalmology Department, Hospital S. João, Porto - Portugal

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Porto, Porto - Portugal

<sup>3</sup>Microbiology Department, Hospital S. João, Porto - Portugal

<sup>4</sup>Microbiology Service/Cequimed, Faculty of Pharmacy, University of Porto - Portugal

**PURPOSE.** *Beauveria bassiana* is a ubiquitous fungus available as an insecticide. In humans, it has limited virulence; to our knowledge, only 3 cases of invasive disease and 10 cases of keratitis have been documented.

**METHODS AND RESULTS.** We report the first case of *B. bassiana* keratitis in a patient with aphakic bullous keratopathy. The fungal keratitis proved to be highly resistant to topical clotrimazole. Molecular identification was based on DNA sequence analysis. The minimal inhibitory concentrations (MIC) obtained were 2 µg/mL for voriconazole, 0.250 µg/mL for posaconazole, and >128 µg/mL for fluconazole; amphotericin B MIC was >16 µg/mL. In the absence of clinical improvement, a penetrating keratoplasty (PK) was performed. The patient was discharged on topical and systemic voriconazole and prednisolone 40 mg PO/day. The eye remained calm with a transparent cornea and clear anterior chamber.

**CONCLUSIONS.** *B. bassiana* keratitis is extremely rare, with only a few cases reported. Its risk factors are unknown. We report the first case in a patient with aphakic bullous keratopathy, which proved highly resistant to antifungal therapy (antifungal susceptibility results are presented). A PK was necessary for clinical improvement. A review of the literature is performed in an effort to define therapeutic strategies.

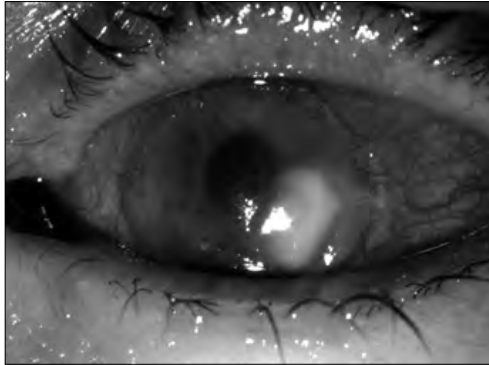
**KEY WORDS.** Antifungal sensitivity, *Beauveria*, Bullous keratopathy, Fungal keratitis, Keratoplasty

Accepted: March 11, 2012

## INTRODUCTION

*Beauveria* fungal genus holds an interesting place in microbiology history, as it was the first organism shown to cause a disease, the muscardine disease of the silkworm (1). *Beauveria* is a ubiquitous fungus found naturally in soil and can infect and kill susceptible insects; due to its entomopathogenic properties, it is commercialized as a safe (Biosafety Level 1) agricultural and garden insecticide (2), although no *Beauveria*-containing biopesticides are approved for use in Portugal. *Beauveria* exhibits limited viru-

lence in humans; to our knowledge, only 3 cases of invasive *Beauveria* disease (3-5) and 10 cases of *Beauveria* keratitis have been documented in the PubMed literature so far. All the aforementioned cases have occurred in association with eye trauma or soft contact lens wear. Here we report the case of a nontraumatic unilateral necrotizing keratitis in the context of aphakic bullous keratopathy. To our knowledge, this is the first case of *Beauveria bassiana* keratitis ever reported in such a condition. In addition, we performed antifungal sensitivity testing on the isolated strain of *B. bassiana*.



**Fig. 1** - Enlarging corneal ulcer with limbal neovascularization.



**Fig. 2** - Keratitis with invasion of the anterior chamber and a hypopyon.

## Case report

In late November 2008, a 79-year-old diabetic and hypertensive woman, from Maia, in northern Portugal, presented to the hospital with left eye stromal keratitis with ill-defined borders and a small epithelial defect, without previous history of trauma. She denied present or past contact lens wear. She lived in a rural area and kept a garden, but denied any contact with pesticides. Cataract surgery had been performed in both eyes 30 years before. She had been left aphakic and developed bilateral bullous keratopathy. She was on oral antidiabetic medications, simvastatin, hydrochlorothiazide, and losartan.

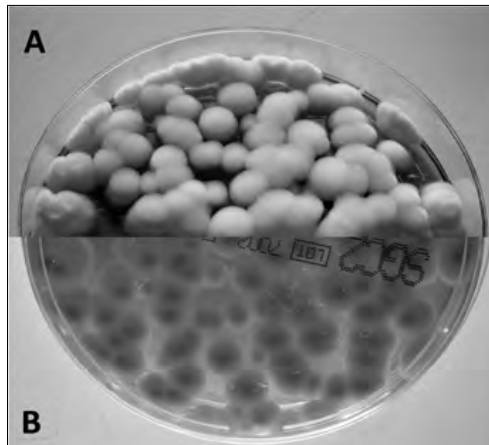
Her visual acuities were 20/100 on the right and 20/200 on the left. Corneal swabs were collected. The patient was given levofloxacin eyedrops 5 times a day and chloramphenicol ointment for the sleeping hours. Clotrimazole (the only topical antifungal drug commercially available in Portugal) was added because contact with soil or vegetable matter could not be safely ruled out.

One week later, her visual acuity was counting fingers at 20 centimeters and the stromal keratitis had enlarged with flare and cells in the anterior chamber and growing limbal neovascularization (Fig. 1). Cyclopentolate was added. Topical steroids were avoided because of concern with aiding microbial growth. Cultures were negative and swabs were again obtained. Nevertheless, 2 weeks later the keratitis seemed to start improving, the stromal infiltrate appeared to be smaller, and the anterior chamber looked quiet. Cultures were again negative.

In early January 2009, the picture had worsened. There was deep stromal invasion into the anterior chamber with a hypopyon (Fig. 2). The patient was admitted to the hospital and a paracentesis was performed with aqueous tap sent for cultural examination. Fluconazole was administered in the anterior chamber. She was started on fortified antibiotics (cephradine plus gentamicin) and oral fluconazole 200 mg 3 times a day. In the succeeding days, her visual acuity was reduced to light perception. Since a fungal etiology was strongly suspected, another corneal scraping was performed and the patient was given topical and systemic voriconazole (200 mg per OS BID) because of a concern of drug resistance.

## Microbiology

Three months had passed and only on the fifth swab was the isolation of *B. bassiana* accomplished. The swab was cultured on blood and chocolate agar (bioMérieux) incubated at 37°C, and on Sabouraud-gentamicin-chloramphenicol agar (bioMérieux) incubated at 25°C. The mold never grew at 37°C, in accordance with other reports (3, 4). By day 4, growth was noticed at 25°C, and by day 9, colonies were cottony, white, raised, and dome-shaped (Fig. 3). A lactophenol cotton-blue tease preparation observed with the light microscope showed conidiogenous cells in small clusters alongside hyphae. Some exhibited distended base tapering into smaller ones; on occasions they presented a geniculated shape ending in a small group of single-celled oval, smooth conidia, pointing to *B. bassiana* species (Fig. 4). Species molecular identification

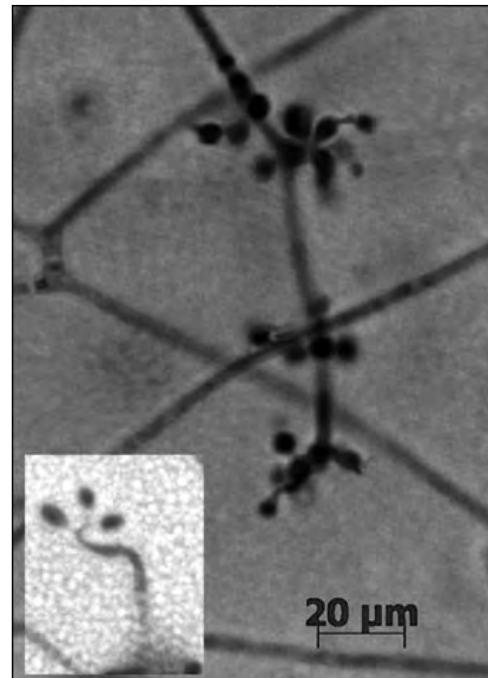


**Fig. 3** - *Beauveria bassiana* culture colonies as observed on Sabouraud-gentamicin-chloramphenicol medium (A) and from the back of the Petri dish (B).

was based on DNA sequence analysis. A fragment of internal transcribed spacer region (ITS2) was amplified (Fungi ITS2®, Qiagen) and sequenced (Pyromark®, Biotage). The resulting 50-pb sequence was aligned using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and compared with several *Beauveria* ITS2 sequences from GenBank database. It showed the highest homology (100%) with *B. bassiana*. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal effective concentration (MEC) were calculated using Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) protocol for filamentous fungi. The MICs obtained were 2 µg/mL for voriconazole, 0.250 µg/mL for posaconazole, and >128 µg/mL for fluconazole; amphotericin B MIC was >16 µg/mL. As to MECs, they were 0.250 µg/mL for caspofungin and 0.125 µg/mL for anidulafungin.

### Outcome

In the absence of clinical improvement, a tectonic penetrating keratoplasty (PK) was performed with a recipient trephination of 7.75 mm and a donor trephination of 8.00 mm, previously submerged in voriconazole. A cyclitic trabecular membrane was removed and the anterior chamber was irrigated with voriconazole. A running suture was performed after 4 cardinal sutures (Fig. 5).

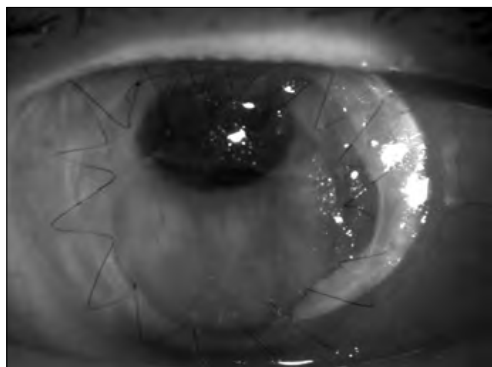


**Fig. 4** - Light microscopy of fungal hyphae stained with lactophenol cotton-blue (insert shows detail of conidia).

The patient was discharged a few days later on topical voriconazole, levofloxacin, and dexamethasone, and systemic voriconazole 400 mg per OS and prednisolone 40 mg per OS both once daily. The eye remained calm with mild corneal edema, a clear anterior chamber, and a regular pupil. The visual acuity improved to about 20/200 on the left and remained at 20/100 on the right due to bullous keratopathy. However, vision was lost in the left eye 1 month later because of a total retinal detachment.

### DISCUSSION

It is of note that reported *Beauveria* keratitis cases now exceed those of systemic infection. This may illustrate *Beauveria*'s low pathogenicity to human hosts. *Beauveria* produces the enzyme chitinase, which enables it to adhere



**Fig. 5** - Immediate postoperative appearance following tectonic penetrating keratoplasty.

and penetrate the chitin-composed cuticle of *Arthropoda*, with subsequent invasion of the hemolymph, providing the rationale for its use as an insecticide. *B. bassiana*'s different cellular forms and their interaction with hydrophilic and hydrophobic barriers similar to chitin may ensure its adhesion to the corneal tissue, as well as progressive stromal invasion, facilitated by the relative immunotolerance and avascularity of the cornea (2). Given the case of our patient, we suggest that an edematous cornea with epithelial bullae and erosions as found in bullous keratopathy may enhance stromal invasion by fungal cells. It has been suggested in previous work that trauma, contact with plants or soil, and contact lens use may play a role as risk factors (2, 6-8). Although our patient denied any previous trauma, residency in rural areas may increase the likelihood of such exposures. Our patient was 79 years old and had been diabetic for 20 years. Diabetes mellitus is often cited among systemic risk factors for fungal disease (7, 9). Older age may also increase the likelihood of fungal infection, but confounding variables surely play a role as the other risk factors also increase with age. It is of note that 8 of the 10 keratitis cases reported have been over 55 years old (the youngest, 44 years old; the oldest, 82 years old).

*B. bassiana* may prove difficult to grow in culture (2). In our report, growth in culture only occurred in Sabouraud-gentamicin-chloramphenicol agar at 25°C. We performed molecular identification of the *Beauveria* species by DNA sequence analysis. The value of PCR has been assessed in recent work and was found to simultaneously allow the

detection and quantification of bacteria or fungi in patients with microbial keratitis, thus serving as a fast adjunct in pathogen identification (10).

While on levofloxacin, chloramphenicol, and clotrimazole, our patient's condition improved and thus the same medication was kept, but 3 weeks later the condition worsened with anterior chamber invasion. Why did the early improvement occur? One hypothesis would be the indolent fungal growth versus the high concentrations achieved by the topical medication. Drug corneal penetration may have been enhanced by an epithelial defect. Also, it is well known that several bactericidal drugs exhibit moderate antifungal activity as well (ie, chloramphenicol, fluoroquinolones, aminoglycosides), as do some preservatives such as benzalkonium chloride. Such combined antifungal activity may have contributed to the mild improvement experienced by our patient in the first weeks of her treatment. Afterwards, because of further deterioration, we started the patient on topical and oral voriconazole 200 mg bid, but this did not alter the evolution of the disease. This drug has been used successfully before (7), but in the case reported by Tu and Park (2) improvement occurred only after the addition of oral posaconazole to topical voriconazole.

There is only one report on *B. bassiana* susceptibility to drugs (9). It is well known that fungi exhibit great intraspecies disparity in their response to antifungal drugs, often with poor correlation with sensitivity testing (2). Furthermore, drug sensitivity is related to serum concentrations, which may differ widely from those obtained in ocular tissues. The *B. bassiana* strain isolated from our patient showed poor in vitro sensitivity to voriconazole (MIC 2 µg/mL) and frank resistance to amphotericin B (MIC >16 µg/mL) and fluconazole (MIC >128 µg/mL). Both drugs, given empirically to our patient, had failed to deter the keratitis progression. The strain was, however, extremely sensitive to posaconazole (MIC 0.250 µg/mL) and to the echinocandins (MECs 0.250 µg/mL for caspofungin and 0.125 µg/mL for anidulafungin). The strain in the work by Sonoyama et al was also found to be resistant to amphotericin B (MIC 8) and fluconazole (MIC 256), although it was sensitive to itraconazole (MIC 0.25) and voriconazole (MIC 0.5) (9). The presented data regarding *B. bassiana* sensitivity to antifungal drugs clearly suggests that amphotericin B and fluconazole should be avoided as initial options because of a high probability of resistance. We also believe posaconazole should be considered early in any *Beauveria* keratitis resistant to other antifungals.

Our patient's lack of response to pharmacologic treatment demanded a surgical option as the only way of clearing the focus of infection. As lamellar keratoplasty would be ineffective in our patient given that the disease had already penetrated deep into the cornea to the anterior chamber, we chose to perform a tectonic PK with anterior chamber lavage with saline and voriconazole. The decision to previously submerge the donor cornea in voriconazole was an empirical one, as no such rationale exists. Xie and colleagues performed a review of 108 patients in whom PK was found to be effective for early and complete removal of all infected tissue in fungal keratitis (11). Penetrating keratoplasty was also shown to contribute to eye preservation and visual recovery in case of corneal perforation (12). Since therapeutic keratoplasty has an increased risk of graft rejection when compared with optical grafts (13), topical dexamethasone and oral prednisolone 40 mg a day were added to prevent early graft rejection, as we were certain of a complete surgical excision plus adequate antibiotic coverage. A recent review of 899 patients identified pre-operative hypopyon, corneal perforation, corneal infection expanding to limbus, or lens infection with extracapsular cataract extraction as being major risk factors for recurrent fungal keratitis after keratoplasty (14). Our patient had 2 such factors, but she experienced an uneventful recovery with no signs of recurrence, although a total retinal detachment was diagnosed early. That is a well-established, albeit rare, complication of PK, and our patient might have had a greater baseline risk, being aphakic for 30 years. Our report suggests a possible role for bullous keratopathy as a risk factor for *Beauveria* keratitis. We also show that DNA sequence analysis can be paramount in the precise identification of fungal species. The characterization of *Beauveria*'s sensitivity to current antifungal drugs may allow a better choice of initial therapy. We demonstrate that adequate surgical management plays a pivotal role and is sometimes the only curative approach, ascertaining a fair prognosis. Further reports are needed as it would be desirable to better define the epidemiology of *B. bassiana* eye infection and to know the evolution of its susceptibility to drugs, with the ultimate goal being the formulation of effective treatment strategies.

Address for correspondence:  
Dr. Luis Figueira  
Faculty of Medicine  
Alameda Prof. Hernani Monteiro  
4200 Porto, Portugal  
luisfigueira.md@gmail.com

## REFERENCES

1. Sachs SW, Baum J, Mies C. *Beauveria bassiana* keratitis. *Br J Ophthalmol* 1985; 69: 548-50.
2. Tu EY, Park AJ. Recalcitrant *Beauveria bassiana* keratitis: confocal microscopy findings and treatment with posaconazole (Noxafil). *Cornea* 2007; 26: 1008-10.
3. Henke MO, De Hoog GS, Gross U, Zimmermann G, Kraemer D, Weig M. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2698-702.
4. Tucker DL, Beresford CH, Sigler L, Rogers K. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5412-4.
5. Gürçan S, Tuğrul HM, Yörük Y, Ozer B, Tatman-Otkun M, Otkun M. First case report of empyema caused by *Beauveria bassiana*. *Mycoses* 2006; 49: 246-8.
6. Low CD, Badenoch PR, Coster DJ. *Beauveria bassiana* keratitis cured by deep lamellar dissection. *Cornea* 1997; 16: 698-9.
7. Pariseau B, Nehls S, Ogawa GS, Sutton DA, Wickes BL, Romanelli AM. *Beauveria* keratitis and biopesticides: case histories and a random amplification of polymorphic DNA comparison. *Cornea* 2010; 29: 152-8.
8. Oh JY, Lee MJ, Wee WR, Heo JW. A case of necrotizing sclerokeratitis and endophthalmitis caused by *Beauveria bassiana*. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53: 551-3.
9. Sonoyama H, Araki-Sasaki K, Kazama S, et al. The characteristics of keratomycosis by *Beauveria bassiana* and its successful treatment with antimycotic agents. *Clin Ophthalmol* 2008; 2: 675-8.
10. Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y. Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cycling probe in patients with corneal ulcer. *Arch Ophthalmol* 2010; 128: 535-40.
11. Xie L, Dong X, Shi W. Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 1070-4.
12. Xie L-X, Zhai H-L. [Penetrating keratoplasty for treatment of fungal keratitis with corneal perforation.] *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2005; 41: 1009-13.
13. Sharma N, Sachdev R, Jhanji V, Titiyal JS, Vajpayee RB. Therapeutic keratoplasty for microbial keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2010; 21: 293-300.
14. Shi W, Wang T, Xie L, et al. Risk factors, clinical features, and outcomes of recurrent fungal keratitis after corneal transplantation. *Ophthalmology* 2010; 117: 890-6.

The authors report no proprietary interest or financial support.





*Elizabethkingia meningoseptica* and Contact Lens Use



## Elizabethkingia meningoseptica and Contact Lens Use

### Elizabethkingia meningoseptica e o Uso de Lentes de Contato



CASO CLÍNICO

João N. BEATO<sup>1</sup>, Maria J ESPINAR<sup>2,3</sup>, Luís FIGUEIRA<sup>1,4</sup>, Yuliana O. EREMINA<sup>3</sup>, Manuela RIBEIRO<sup>3</sup>, Raúl MOREIRA<sup>1</sup>, Fernando FALCÃO-REIS<sup>1,5</sup>  
Acta Med Port 2016 Apr;29(4):287-289 • <http://dx.doi.org/10.20344/amp.7048>

#### ABSTRACT

A 47-year-old man presented to our emergency department complaining of acute ocular pain and redness of his left eye. Ophthalmological antecedents included use of semi-rigid contact lens and primary open-angle glaucoma. Slit-lamp examination revealed a small central corneal ulcer associated with stromal inflammatory infiltrate. Scraping from the corneal ulcer was positive for *Elizabethkingia meningoseptica*. He was empirically treated with topical 0.5% levofloxacin and 0.3% gentamicin, and five weeks later the infection had resolved. In this case report we describe the uncommon association between contact lens and *Elizabethkingia meningoseptica*. Despite possible serious complications associated with this atypical agent, prompt diagnosis and adequate treatment lead to good visual prognosis.

**Keywords:** Contact Lenses; Corneal Ulcer; Chryseobacterium; Flavobacteriaceae Infections; Keratitis.

#### RESUMO

Doente de 47 anos, sexo masculino, recorreu ao serviço de urgência por início súbito de dor ocular e hiperemia conjuntival no olho esquerdo. Os antecedentes oftalmológicos incluíam o uso de lente de contacto semi-rígida e glaucoma primário de ângulo aberto. O exame na lâmpada de fenda revelou uma pequena úlcera de córnea central associada a infiltrado inflamatório estromal. A zaragatoa da base da úlcera de córnea permitiu a identificação de colónias de *Elizabethkingia meningoseptica*. O doente foi empiricamente tratado com levofloxacina colírio 0,5% e pomada de gentamicina 0,3%, tendo a infeção resolvido após cinco semanas. Neste caso clínico, descrevemos a associação incomum entre lentes de contacto e *Elizabethkingia meningoseptica*. Apesar das possíveis complicações graves relacionadas com este agente etiopatogénico, o diagnóstico rápido e tratamento adequado permitiram um bom prognóstico visual.

**Palavras-chave:** Chryseobacterium; Infecções por Flavobacteriaceae; Lentes de Contacto; Queratite; Úlcera de Córnea.

#### INTRODUCTION

*Elizabethkingia meningoseptica*, formerly known as *Flavobacterium meningosepticum*, belongs to the family of *Flavobacteriaceae*. It is widely distributed in different geographical areas and habitats, but not in human microflora.<sup>1</sup> We describe the first clinical case of corneal ulcer caused by *E. meningoseptica* registered in Europe.

#### CASE REPORT

A 47-year-old caucasian man presented to the ophthalmology emergency department of the Centro Hospitalar São João (Porto, Portugal) in August 2013 with a two day history of increasing pain and redness of his left eye (OS). He had no relevant systemic antecedents but he was regularly followed in the outpatient department due to primary open-angle glaucoma (treated with topical latanoprost, brimonidine, timolol and brinzolamide) and pathological myopia. Right eye visual acuity (VA) was hand movement due to terminal glaucoma. Ophthalmological antecedents also included the use of semi-rigid contact lens in the left eye. On our first examination, left eye visual acuity was 20/32 and biomicroscopy revealed a stromal keratitis with ill-defined borders and a small epithelial

defect measuring 0.5 mm x 0.5 mm (Fig. 1). Scrapings from corneal ulcer and lower conjunctival fornix were sent for microbiological testing and topical empiric treatment (0.5% levofloxacin drops 1/1 hour and 0.3% gentamicin ointment 4/4 hours for 3 days) was prescribed. Evaluation 72 hours later showed loose re-epithelialization of the ulcer and

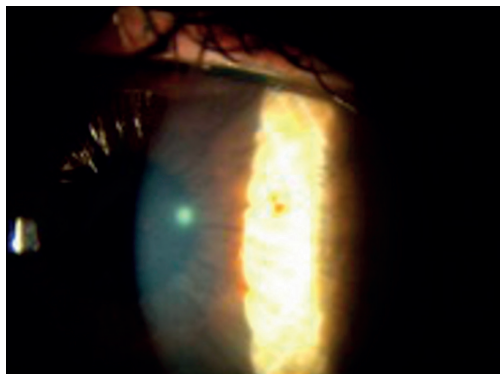


Figure 1 - Slit-lamp examination revealed a central corneal ulcer 0.5 x 0.5 mm with stromal inflammatory infiltrate

1. Department of Ophthalmology. São João Hospital Centre. Porto, Portugal.

2. Department of Microbiology. Faculty of Medicine. University of Porto. Porto, Portugal.

3. Department of Clinical Pathology. São João Hospital Centre. Porto, Portugal.

4. Department of Pharmacology and Therapeutics. Faculty of Medicine. University of Porto. Porto, Portugal.

5. Department of Sense Organs. Faculty of Medicine. University of Porto. Porto, Portugal

✉ Autor correspondente: João N. Beato. joao.nuno.beato@gmail.com

Recebido: 02 de outubro de 2015 - Aceite: 24 de janeiro de 2016 | Copyright © Ordem dos Médicos 2016



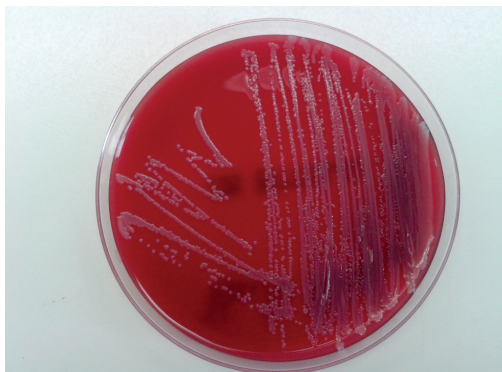


Figure 2 - Growth of yellowish colonies in blood sheep agar medium (24 hours after incubation with CO<sub>2</sub> atmosphere)

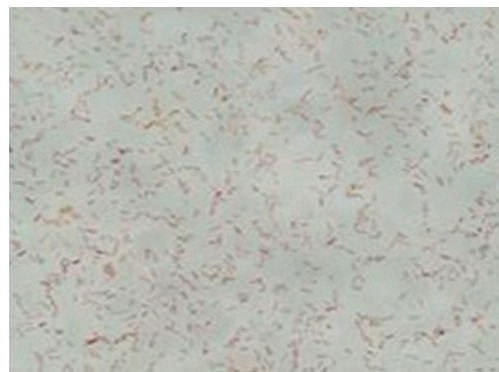


Figure 3 - Gram negative rods, gram stain (x1000)

a micro-abscess. At this time, we decided to remove the epithelium and the infected stroma.

Bacterial cultures of the conjunctival swab were negative. However, culture of the corneal ulcer showed prominent growth of yellowish colonies on 5% sheep blood agar plates (Fig. 2) and no growth on MacConkey agar, a selective media for Gram negative bacilli. The isolate was subsequently identified as *Elizabethkingia meningoseptica* using a matrix-assisted laser-desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (VITEK MS) and VITEK2 system (GN Card). Conventional methods like Gram stain, oxidase, catalase and indole tests were additionally performed (Fig. 3). According to guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute, minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by E-test, presenting bacteria susceptibility to levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, tigecycline, vancomycin and resistance to tobramycin, imipenem, ceftazidime and colistin.

After one week, a small central leucoma developed with no evidence of epithelial defect. Levofloxacin drops and gentamicin ointment were tapered and we decided to add 0.1% fluorometholone 8/8h. Two weeks later the patient had no complaints, yet slit-lamp examination revealed superficial punctate keratitis associated with the central leucoma. The patient completed a tapering course of the antibiotics and 5 weeks after our initial observation the infection was totally healed.

## DISCUSSION

Ocular infections caused by *Elizabethkingia meningoseptica* are extremely rare and frequently associated with local predisposing conditions. Ocular surgery (penetrating keratoplasty)<sup>2</sup> and trauma,<sup>3-5</sup> contact lens use<sup>6,7</sup> or ocular surface disorders<sup>8-10</sup> have been identified as possible risk factors. In our patient, combination of long term topical ocular hypotensive drugs and contact lens use might have created the perfect environment for *Elizabethkingia* to grow. Both conditions are known to significantly change ocular surface and predispose to

corneal infection.

Contact lens and its case were not available for examination, so it was not possible to ascertain the origin of contamination. However, it is the most probable etiology since *Elizabethkingia* can survive in chlorine-treated municipal water used to wash contact lens case.<sup>11</sup>

Our case report highlights the importance of correct microbiological diagnosis in patients with predisposing factors for corneal infections. Typically, *Elizabethkingia* infections have a poor prognosis due to its unusual resistance patterns to routinely used antibiotics (beta-lactams, aminoglycosides and chloramphenicol).<sup>12</sup> However, a correct microbiological diagnosis and adequate treatment can lead to good clinical response and minor sequelae as in this case.

## Meeting presentation

"24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases", Barcelona, Spain, May 10-13<sup>th</sup> 2014.

"5th Congress of the European Society of Cornea and Ocular Surface disease Specialists-EUCORNEA", London, United Kingdom, September 12-13<sup>th</sup> 2014.

"Congress of European Society of Ophthalmology", Vienna, Austria, June 6-9<sup>th</sup> 2015.

## PROTECTION OF HUMANS AND ANIMALS

The authors declare that the procedures were followed according to the regulations established by the Clinical Research and Ethics Committee and to the Helsinki Declaration of the World Medical Association.

## DATA CONFIDENTIALITY

The authors declare having followed the protocols in use at their working center regarding patient's data publication.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## FUNDING SOURCES

This study was supported by the Ophthalmology and

Clinical Pathology departments of Centro Hospitalar São João, Porto, Portugal.

## REFERENCES

1. Hoque SN, Graham J, Kaufmann ME, Tabaqchali S. Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect. 2001;47:188-92.
2. LeFrancis M, Baum JL. Flavobacterium endophthalmitis following keratoplasty. Use of a tissue culture medium-stored cornea. Arch Ophthalmol. 1976;94:1907-9.
3. Essex RW, Charles PG, Allen PJ. Three cases of post-traumatic endophthalmitis caused by unusual bacteria. Clin Exp Ophthalmol. 2004;32:445-7.
4. Connell PP, Wickremasinghe S, Devi U, Waters Mj, Allen PJ. Self-induced Elizabethkingia meningoseptica endophthalmitis: a case report. J Med Case Rep 2011;5:303.
5. Erdem E, Abdurrahmanoglu S, Kibar F, Yagmur M, Koksall F, Ersoz R. Posttraumatic keratitis caused by Elizabethkingia meningosepticum. Eye Contact Lens. 2013;39:361-3.
6. Yang YS, Chun JW, Koh JW. Keratitis with Elizabethkingia meningoseptica occurring after contact lens wear: a case report. Korean J Ophthalmol. 2013;27:133-6.
7. Ray M, Lim DK. A rare polymicrobial keratitis involving Chryseobacterium meningosepticum and Delftia acidovorans in a cosmetic contact lens wearer. Eye Contact Lens. 2013;39:192-3.
8. Bloom AH, Perry HD, Donnenfeld ED, Davis RG. Chryseobacterium meningosepticum keratitis. Am J Ophthalmol. 2003;136:356-7.
9. Bucci FA, Jr., Holland EJ. Flavobacterium meningosepticum keratitis successfully treated with topical trimethoprim-sulfamethoxazole. Am J Ophthalmol. 1991;111:116-8.
10. Li EY, Jhanji V. Massive lipid keratopathy after Elizabethkingia meningosepticum keratitis. Cont Lens Anterior Eye. 2014;37:55-6.
11. Wu YT, Willcox M, Zhu H, Stapleton F. Contact lens hygiene compliance and lens case contamination: a review. Cont Lens Anterior Eye. 2015;38:307-16.
12. Ratnamani MS, Rao R. Elizabethkingia meningoseptica: Emerging nosocomial pathogen in bedside hemodialysis patients. Indian J Crit Care Med. 2013;17:304-7.



Concentration Gradient of Endogenous Noradrenaline from Periphery to  
Centre in the Rabbit Cornea





## Concentration gradient of endogenous noradrenaline from periphery to centre in the rabbit cornea

Luis Figueira<sup>1,2</sup>, Joana Matos<sup>1</sup>, Paula Serrao<sup>1</sup>, Fernando Falcao-Reis<sup>2</sup>, Daniel Moura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine of the University of Porto, Portugal

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Hospital S. João, Porto, Portugal

### ABSTRACT.

**Purpose:** The source of endogenous catecholamines that activate corneal adrenoceptors is largely unknown. Since the cornea is a densely innervated tissue we hypothesised that the major source would be the neuronal release of noradrenaline (NA) from intrinsic sympathetic nerves rather than circulating or non-neuronal local production.

**Methods:** Three concentric segments (central, intermediate, peripheral) were obtained by double trephination (9.5–7.25 mm) performed on corneas harvested from 3–4 month old rabbits, along with aqueous humor and blood samples. Endogenous catecholamines were quantified by HPLC-EC. Results are means±SEM. ANOVA was used for statistical analysis.

**Results:** NA and adrenaline (AD) were identified in all corneal segments (n=15/16) at the following concentrations: 101.3±24.1 pmol/g for NA, 4.8±2.7 pmol/g for AD in the centre; 76.8±18.8 pmol/g for NA, 23.0±11.1 pmol/g for AD in the intermediate segment; 317.0±135.7 pmol/g for NA and 11.1±6.1 pmol/g for AD in the periphery. Statistically significant (P<0.05) were the differences between: 1) NA concentrations in peripheral segments and those either in central or intermediate segments; 2) NA and AD concentrations in all segments. In the aqueous humor concentrations of NA were 77.0±9.8 nmol/L (n=6) and no AD was found. Plasma concentrations (n=4) were 28.0±2.5 nmol/L for NA, 36.2±8.5 nmol/L for AD.

**Conclusions:** There is a concentration gradient for NA decreasing from the corneal periphery towards the centre. In contrast, no such gradient exists for AD. Moreover, NA is the most abundant of the two catecholamines in all segments, whereas in the plasma AD predominates. Taken together, these results suggest that corneal NA is mostly of neuronal origin.

**Key words:** cornea; catecholamines; noradrenaline; adrenaline; concentration gradient; sympathetic nerves; rabbit

Acta Ophthalmol.

© 2012 The Authors

Acta Ophthalmologica © 2012 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-3768.2012.2233.x/full>

## Introduction

The cornea is a densely innervated tissue expressing several types of adrenoceptors (Liu, Trope & Basu 1990, Walkenbach et al. 1991, Walkenbach et al. 1992). The presence of corneal sympathetic nerves has been described (Marfurt & Ellis 1993, Toivanen et al. 1987) and corneal epithelial cells have been shown to express enzymes for the synthesis of adrenaline (Pullar et al. 2007).

Corneal epithelial cell proliferation has dual regulation by an adrenergic "off" response dependent on cAMP and by a muscarinic "on" response dependent on cGMP (Ghoghawala et al. 2008). Signalling pathways involving cAMP/ PKA may thus be related to important corneal functions (Grueb, Bartz-Schmidt & Rohrbach 2008) such as tissue regeneration and homeostasis, including maintenance of transparency.

However, questions such as which catecholamine is more abundant and what is their main endogenous source (neuronal, local or hematogenous) remain largely unanswered.

We hypothesised that such major source would be the neuronal release of noradrenaline (NA) from intrinsic sympathetic nerves rather than circulating or non-neuronal local production. The aim of the present work is to test whether corneal NA is mostly of neuronal origin.

## Materials and Methods

**Setting.** Whole eyes were obtained from 3-4 month old New Zealand White male rabbits lodged in the vivarium of the Faculty of

Medicine of the University of Porto. Only animals euthanised because of unrelated experimental protocols were used in order to avoid sacrifice for the sole purpose of obtaining the eyes.

Corneas were harvested by standard pericorneal trephination. Aqueous humour was obtained by anterior chamber paracentesis prior to trephination. Blood samples were obtained by peripheral venous puncture.

Tissues were preserved in a storage medium developed for human corneas (Optisol GS®, Bausch&Lomb, USA) and subsequently stored at 4°C.

**Assessment of tissue viability and characterisation of rabbit corneas.** Endothelial cell viability often accounts for corneal graft viability and as such full corneal tissue was observed under specular microscopy to assess endothelial cell integrity, morphology (pleomorphism and polimegatism) and density (number of cells per square millimetre). As an indirect measure of endothelial function, corneal thickness was also evaluated by ultrasonic pachymetry.

**Tissue preparation.** In all samples the pericorneal scleral tissue was removed and three concentric segments (central, intermediate, peripheral) were produced by additional double trephination (wider trephination of 9.5 mm followed by a narrower trephination of 7.25 mm) (Figure 1). Aqueous humour was kept unpreserved while refrigerated. All experiments were conducted on the same day of harvesting.

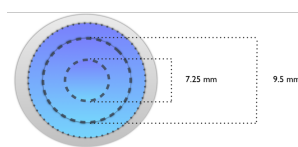


Figure 1 — Double trephination technique with production of three concentric corneal segments.

**HPLC-ED assay of catecholamine content** (Moura, Azevedo & Guimarães 1990). All tissues and fluids sampled were stored in

perchloric acid 0.2 M at -80°C. High pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) was used to quantify

endogenous catecholamines along with its precursors and metabolites. In brief, aliquots of HClO<sub>4</sub>, in which tissues had been kept were placed in 5 mL conical-base glass vials with 50 mg alumina, and the pH of the samples was adjusted to pH 8.6 by addition of Tris buffer. The adsorbed catecholamines were then eluted from the alumina with 200 µL of 0.2 mol/L HClO<sub>4</sub> on Costar Spin-X microfilters; 50 µL of the eluate was injected into an HPLC (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France). The lower limit of detection of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), dopamine, norepinephrine, epinephrine, ranged from 350 to 1000 fmol (Soares-da-Silva et al. 1995).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means ± SEM. Analysis of variance with Tukey correction for multiple comparisons was used to test for differences between unpaired results. A probability level of 0.05 or less was considered statistically significant.

## Results

**Assessment of tissue viability and characterisation of rabbit corneas.** Specular microscopy revealed a mean endothelial cell density of 2552.8 cells per square millimetre (n=16). Mean ultrasonic pachymetry was 712 micrometres in the central cornea.

**HPLC-ED assay of catecholamine content.** NA and adrenaline (AD) were identified in all corneal segments (n=16) at the following concentrations: 101.3±24.1 pmol/g for NA and 4.8±2.7 pmol/g for AD in the centre; 76.8±18.8 pmol/g for NA and 23.0±11.1 pmol/g for AD in the intermediate segment; 317.0±135.7 pmol/g for NA and 11.1±6.1 pmol/g for AD in the periphery (Figures 2, 3a and 3b).

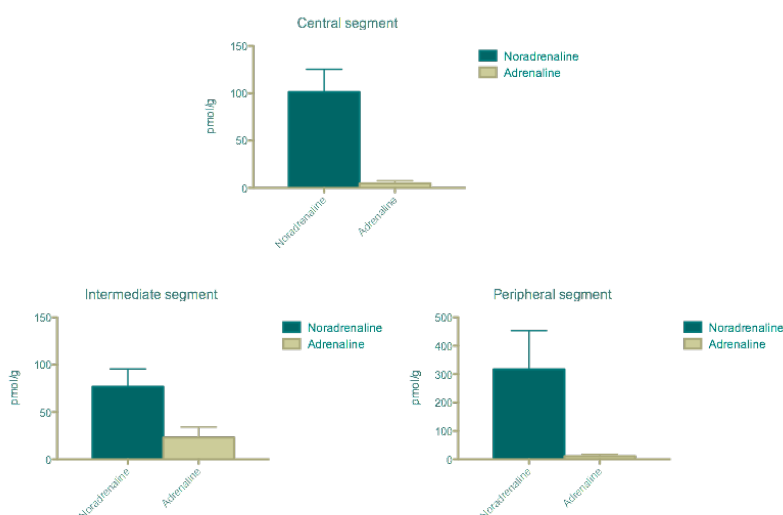
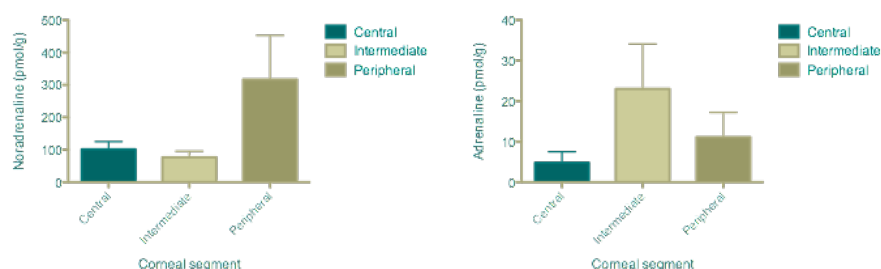


Figure 2 — Catecholamine concentration in the different segments of the rabbit cornea.



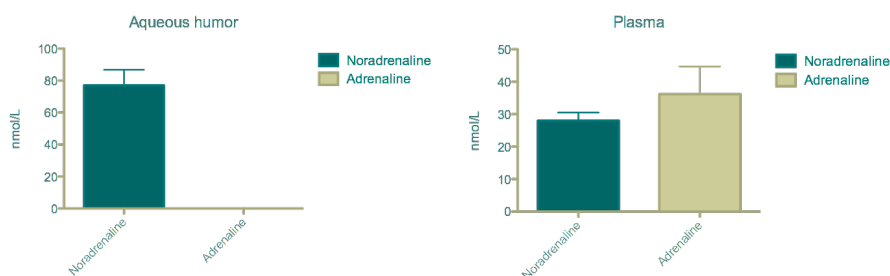
Figures 3a and 3b — Distribution of concentrations for each amine (3a, noradrenaline; 3b, adrenaline) per corneal segment in the rabbit cornea; a concentration gradient, decreasing from the periphery towards the centre, is discernible for noradrenaline.

Statistically significant were the differences between:

- 1) NA and AD concentrations in all segments ( $P < 0.0001$ );
- 2) NA concentrations in peripheral segments and those either in central or intermediate segments ( $P = 0.0002$ ).

In the aqueous humour ( $n=15$ ) concentrations of NA were  $77.0 \pm 9.8$  nmol/L and no AD levels were found ( $P < 0.0001$ ) (Figure 4a).

Venous plasma concentrations ( $n=4$ ) were  $28.0 \pm 2.5$  nmol/L for NA and  $36.2 \pm 8.5$  nmol/L for AD ( $P = 0.45$ ) (Figure 4b).



Figures 4a and 4b — Catecholamine concentration in the aqueous humour (4a) and in venous plasma (4b) of rabbits

## Discussion

**Assessment of tissue viability and characterisation of rabbit corneas.** With careful tissue handling, specular microscopy revealed a mean endothelial cell density in rabbit corneas very similar to that of human corneas (Amann et al. 2003, Laule et al. 1978).

Such values suggest good preservation conditions and thus support tissue viability for experiment conduction. Nevertheless, mean central ultrasonic pachymetry was compatible with corneal edema, expected as a consequence

of the harvesting insult plus subsequent over-hydration associated with the storage medium.

#### **HPLC-ED assay of catecholamine content.**

NA was found to be the most abundant catecholamine in all segments of the cornea. Creation of the double trephination technique (Figure 1) yielded some interesting results, as it allowed us to detect a concentration gradient for NA, decreasing from the corneal periphery towards the centre. In contrast, no such gradient was found for AD (AD is more concentrated in the intermediate corneal segment) (Figures 2 and 3).

In the aqueous humour, only NA was detected (Figure 4a). Its probable origin should be the sympathetic nerves in the iris, since catecholamines are unable to traverse specialised blood-tissue barriers (Abbott et al. 2010, Weil-Malherbe, Axelrod & Tomchick 1959) such as the blood-ocular barrier. Also AD, the main plasma catecholamine (Figure 4b), was not detected. No molecular mechanism is known to exist in the ciliary body leading to secretion of amines in the aqueous (Civan & Macknight 2004, Cole 1977).

The aforementioned levels of NA in the aqueous humour wouldn't produce a concentration gradient in the cornea because

aqueous convection movement over the corneal endothelium would ensure a homogenous amine distribution.

Should the limbal blood vessels be a major source of catecholamines, one would expect higher levels of AD in the peripheral cornea with a gradient similar to NA, but we found evidence on the contrary.

The possibility that other specialised cell types could be producing NA is an obvious limitation of our work. Also, detection of amines doesn't imply that these are actually released to activate corneal adrenoceptors. Moreover, this set of results may not be verifiable in humans.

In conclusion, the existence of a concentration gradient for NA decreasing from the corneal periphery towards the centre points to NA being released peripherally. Local corneal production would not explain such disparity. Also, such gradient doesn't occur with AD, nor is AD as abundant as NA.

Taken together, our results suggest that corneal NA is mostly of neuronal origin, and that there is a higher density of sympathetic terminals in the peripheral cornea. These findings warrant clarification with further functional and morphological studies.

## **Acknowledgements**

Joana Afonso, ENG  
Mónica Moreira-Rodrigues, MD, PhD  
Armando Lemos, PhD  
Margarida Duarte-Araújo, MD, PhD

## **References**

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR & Begley DJ (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **37**: 13–25.
- Amann J, Holley GP, Lee SB & Edelhauser HF (2003): Increased endothelial cell density in the paracentral and peripheral regions of the human cornea. *Am J Ophthalmol* **135**: 584–590.
- Civan MM & Macknight ADC (2004): The ins and outs of aqueous humour secretion. *Exp Eye Res*. 625–631.
- Cole DF (1977): Secretion of the aqueous humour. *Exp Eye Res* **25**: 161–176.
- Ghoghawala SY, Mannis MJ, Pullar CE, Rosenblatt MI & Isseroff R (2008):  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Signaling Mediates Corneal Epithelial Wound Repair **49**:

- 1857–1863.
- Grueb M, Bartz-Schmidt KU & Rohrbach JM (2008): Adrenergic regulation of cAMP/protein kinase A pathway in corneal epithelium and endothelium. *Ophthalmic Res* **40**: 322–328.
- Laule A, Cable MK, Hoffman CE & Hanna C (1978): Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol* **96**: 2031–2035.
- Liu GS, Trope GE & Basu PK (1990): Beta adrenoceptors and regenerating corneal epithelium. *J Ocul Pharmacol* **6**: 101–112.
- Marfurt CF & Ellis LC (1993): Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *J Comp Neurol* **336**: 517–531.
- Moura D, Azevedo I & Guimarães S (1990): Differential distribution in, and release from, sympathetic nerve endings of endogenous noradrenaline and recently incorporated catecholamines. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **342**: 153–159.
- Pullar CE, Zhao M, Song B, Pu J, Reid B, Ghoghawala S, McCaig C & Isseroff RR (2007): Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J Cell Physiol* **211**: 261–272.
- Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M, Vieira-Coelho M a, Fernandes MH & Albino-Teixeira A (1995): Assessment of renal dopaminergic system activity in the nitric oxide-deprived hypertensive rat model. *Br J Pharmacol* **114**: 1403–13.
- Toivanen M, Tervo T, Parranen M, Vannas A & Hervonen A (1987): Histochemical Demonstration of Adrenergic Nerves in the Stroma of Human Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **28**: 398–400.
- Walkenbach RJ, Ye GS, Reinach PS & Boney F (1991): Alpha 1-adrenoceptors in human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**: 3067–72.
- Walkenbach RJ, Ye GS, Reinach PS & Boney F (1992): Alpha 1-adrenoceptors in the corneal endothelium. *Exp Eye Res* **55**: 443–450.
- Weil-Malherbe H, Axelrod J & Tomchick R (1959): Blood-Brain Barrier for Adrenaline. *Source Sci New Ser* **129**: 1226–1227.

Concentration Gradient of Noradrenaline from the Periphery to the Centre of  
the Cornea - A Clue to its Origin







## Concentration gradient of noradrenaline from the periphery to the centre of the cornea - A clue to its origin

Luis Figueira<sup>a,b,c,\*</sup>, Carla Ferreira<sup>b</sup>, Catarina Janeiro<sup>a</sup>, Paula Serrao<sup>a,c</sup>, Fernando Falcao-Reis<sup>b</sup>, Daniel Moura<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine of the University of Porto, Portugal

<sup>b</sup> Department of Ophthalmology, Hospital S. João, Porto, Portugal

<sup>c</sup> Center for Drug Discovery and Innovative Medicines, University of Porto, Portugal



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cornea  
Sympathetic nerves  
Noradrenaline origin  
Concentration gradient  
Neuronal topography  
Rabbit  
Human

### ABSTRACT

We set out to demonstrate that the major source of corneal catecholamines is its neuronal release from intrinsic sympathetic nerves rather than circulating or non-neuronal local production. Three concentric segments (central, intermediate, peripheral) were obtained by double trephination (9.5–7.25 mm) performed on corneas harvested from 3 to 4 month old rabbits and human corneas rejected for transplantation, along with aqueous humour, full iris tissue and blood samples. Endogenous catecholamines were quantified by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED), and comparison with the uptake of radio-labelled noradrenaline (3H-NA) before and after incubation with cocaine was performed. Results are means  $\pm$  SEM. Ratios between enzymatic end products and their substrates were calculated. ANOVA was used for statistical analysis. Catecholamine levels were found to be about one log unit lower in the human cornea than in the rabbit cornea. In the rabbit, dopamine (DA), noradrenaline (NA) and adrenaline (AD) were identified by HPLC-ED in all corneal segments, whilst in the human cornea NA was identified only in the intermediate and peripheral corneal segments, and no AD was found. In the iris and aqueous humour only DA and NA were present. A concentration gradient for NA decreasing from the periphery to the centre of the cornea was identified in both species (NA/DA ratio higher than 1 in the periphery; low AD/NA ratio in all corneal segments), but not for DA or AD. After incubation with 3H-NA all corneal segments and iris tissue showed loading with the aforementioned gradient being reproduced, and a decrease in 3H-NA loading after cocaine was significant only in the peripheral corneal segment and in the iris of both species. Reduction in 3H-NA loading after incubation with cocaine shows that NA in the cornea is mostly of neuronal origin and demonstrates the presence of functional sympathetic nerves (also expectedly found in the iris); the existence of a gradient both for 3H-NA loading and loading reduction after cocaine points to a higher density of fibres in the peripheral cornea.

### 1. Introduction

The cornea has one of the highest densities of nerve fibres in mammals and harbours dual innervation, receiving afferent nerves from the trigeminal ganglion and efferent nerves from the superior cervical ganglion (Klyce et al., 1985; Morgan et al., 1987). The latter are known to be sympathetic fibres (Ehinger, 1966; Marfurt and Ellis, 1993; Toivanen et al., 1987), whose function in the cornea is still quite elusive. Corneal nerve dysfunction is a frequent feature of diseases that cause stromal opacities, and these are the second most frequent cause of corneal blindness (Müller et al., 2003; Shaheen et al., 2014).

The cornea is also known to express several types of adrenoceptors

(Pullar et al., 2007; Yasukura et al., 1995). Alpha-1-adrenoceptors regulating inositol phosphate turnover in human and rabbit corneal epithelial cells were documented (Walkenbach et al., 1991) and there is evidence that adrenergic stimulation in corneal epithelial and endothelial cells leads to activation of PKA via stimulation of adenylyl cyclase, and alpha-2A-adrenoceptor stimulation inhibits PKA activity via inhibition of adenylyl cyclase (Grueb et al., 2008). This cAMP-PKA pathway is thought to play a role in important corneal functions such as wound healing or homeostasis. In fact, ocular sympathetic nerves were shown to stimulate rat corneal epithelial proliferation under normal physiological conditions and during corneal wound healing, occurring independently of functional interactions with ocular sensory nerves and

\* Corresponding author. Permanent address: Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine of the University of Porto, Alameda Prof. Hernani Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal.

E-mail address: [figueira@med.up.pt](mailto:figueira@med.up.pt) (L. Figueira).

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.01.008>

Received 9 October 2017; Received in revised form 5 November 2017; Accepted 9 January 2018

Available online 13 January 2018

0014-4835/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

appearing to be related, at least in part, to the release of norepinephrine (Jones and Marfurt, 1996; Müller et al., 2003).

Sympathetic innervation may also exhibit a neurotrophic role in the cornea, as shown in cases of hemifacial atrophy (Parry–Robson syndrome) and Horner syndrome where sympathetic denervation of the cornea may cause endothelial decompensation and corneal edema (Zamir et al., 1999).

Additional research performed in mice submitted to chemical sympathectomy showed increased susceptibility to ocular Herpes Simplex Virus type 1 infection (Templeton et al., 2008).

Published data exists regarding the presence of noradrenaline and adrenaline in the cornea and of the enzymes responsible for their biosynthesis (Pullar et al., 2007). An intrinsic sympathetic system has indeed been proposed to exist in the cornea (Ghoghawala et al., 2008).

However, the source of endogenous catecholamines that activate corneal adrenoceptors remains largely unknown.

We therefore hypothesized that the major source of corneal catecholamines would be the neuronal release of noradrenaline (NA) from intrinsic sympathetic nerves rather than circulating or non-neuronal local production. The aim of the present work is to test whether corneal NA is mostly of neuronal origin.

## 2. Material and methods

### 2.1. Tissue sampling

Corneas were harvested by standard pericorneal trephination from 3 to 4 month old rabbits, along with full iris tissue. Aqueous humour was obtained by anterior chamber paracentesis prior to trephination. Blood samples were obtained by peripheral venous puncture.

Human corneas and full iris tissue were also obtained from the eye bank of Centro Hospitalar S. João, selected among those rejected for transplantation because of donor-related contraindication (e.g. infectious disease). Samples of human aqueous humour were obtained by anterior chamber paracentesis during organ harvesting.

Tissues were preserved in a storage medium developed for human corneas (Optisol GS<sup>®</sup>, Bausch&Lomb, USA) and subsequently stored at 4 °C. Experimental work was carried out in the same day, starting usually within two to 3 h after harvesting.

### 2.2. Assessment of tissue viability and characterisation of human and rabbit corneas

Endothelial cell viability often accounts for corneal graft viability and as such full corneal tissue was observed under specular microscopy to assess endothelial cell integrity, morphology (pleomorphism and polymegatism) and density (number of cells per square millimetre). As an indirect measure of endothelial function, corneal thickness was also evaluated by ultrasonic pachymetry in order to compare human and rabbit corneas.

### 2.3. Tissue preparation

In all samples the pericorneal scleral tissue was removed and three concentric segments (central, intermediate, peripheral) were produced by additional double trephination (wider trephination of 9.5 mm followed by a narrower trephination of 7.25 mm) (Fig. 1).

### 2.4. HPLC-ED assay of catecholamine content (Moura et al., 1990)

All tissues and fluids sampled were stored in perchloric acid 0.2 M at –80 °C. High pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) was used to quantify endogenous catecholamines along with its precursors and metabolites. In brief, aliquots of HClO<sub>4</sub>, in which tissues had been kept were placed in 5 ml conical-base glass vials with 50 mg alumina, and the pH of the samples was adjusted to pH 8.6

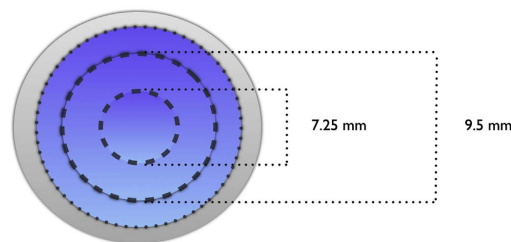


Fig. 1. Double trephination technique with production of three concentric corneal segments.

by addition of Tris buffer. The adsorbed catecholamines were then eluted from the alumina with 200 µL of 0.2 mol/L HClO<sub>4</sub> on Costar Spin-X microfilters; 50 µL of the eluate was injected into an HPLC (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France). The lower limit of detection of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), dopamine, norepinephrine, epinephrine, ranged from 350 to 1000 fmol (Soares-da-Silva et al., 1995).

### 2.5. Cocaine-sensitive uptake of radio-labelled noradrenaline (Moura et al., 1990; Schömig et al., 1991)

Corneal segments and iris tissue were mounted in a 10 ml bath containing aerated (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) modified Krebs–Henseleit solution at 37 °C (Guimaraes and Osswald, 1969) of the following composition (mM): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11, ascorbic acid 0.57 and disodium ethylenediamine-tetraacetic acid 0.03. Tissues were incubated for 30 min in the presence of 100 µM pargyline (monoamine oxidase inhibitor) and then for 60 min with 0.2 µM radioactive tritiated NA (3H-NA), in the presence of 10 µM tolcapone (catechol-O-methyltransferase inhibitor). Half the samples were also incubated in the presence of 12 µM cocaine (inhibitor of the neuronal NA reuptake transporter and thus preventing 3H-NA loading). After washout, tissues were kept overnight in 2 ml of 0.2 M perchloric acid. Radioactivity was measured by liquid scintillation counting (liquid scintillation counter 1209 Rackbeta, LKB Wallac, Turku, Finland) in 2-ml aliquots of perfusate (or 0.5 ml of the acid extract of the tissue + 1.5 ml of Krebs–Henseleit solution), after addition of 8 ml of scintillation mixture (OptiPhase “HiSafe” 3, LKB, Loughborough, England).

### 2.6. Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Analysis of variance with Tukey correction for multiple comparisons was used to test for differences between unpaired results. A probability level of 0.05 or less was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Characterisation of human and rabbit corneas

With similar tissue handling and preservation conditions between human and rabbit corneas, specular microscopy revealed a mean endothelial cell density of 2899.5 cells per square millimetre in the rabbit corneas (n = 45) and of 2587.9 cells per square millimetre in the human corneas (n = 25). Mean central ultrasonic pachymetry was 689 µm in the rabbit corneas and 779 µm in the human corneas.

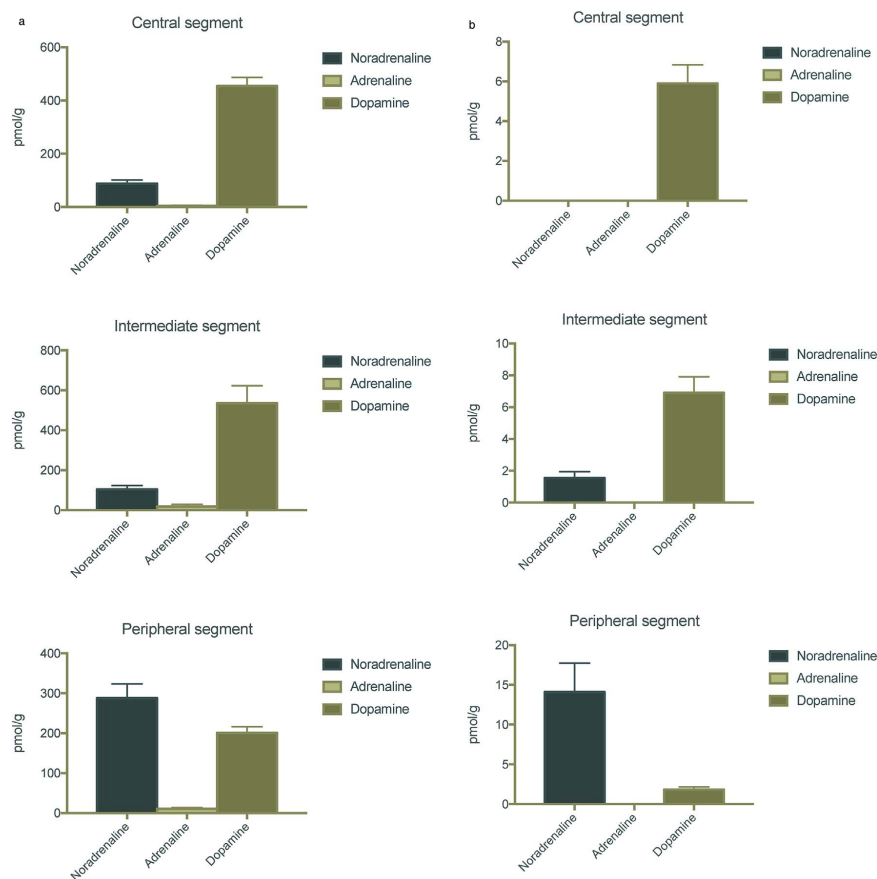
### 3.2. HPLC-ED assay of catecholamine content - Rabbit

NA and adrenaline (AD) were identified in all corneal segments

**Table 1**  
HPLC-ED assay of catecholamine content.

		DOPA	DA	DOPAC	NA	AD	DA/DOPA ratio	DOPAC/DA ratio	NA/DA ratio	AD/NA ratio
Rabbit	Centre (n = 45)	134.89 ± 10.9	454.13 ± 33.32	119.88 ± 12.18	87.75 ± 14.1	3.82 ± 1.7	3.37	0.26	0.19	0.04
	Intermediate (n = 45)	167.07 ± 19.25	535.13 ± 88.1	158.14 ± 13.87	104.07 ± 18.8	18.12 ± 11.1	3.20	0.30	0.19	0.17
	Periphery (n = 45)	84.94 ± 5.57	200.85 ± 15.39	45.13 ± 3.39	287.72 ± 35.7	10.89 ± 3.1	2.36	0.22	1.43	0.04
	Iris (n = 33)	4533.65 ± 107.9	11757.13 ± 22.1	8981.20 ± 194.5	34524.29 ± 13.5	0	2.59	0.76	2.94	0
	Aqueous (n = 33)	23.51 ± 2.02	85.50 ± 5.79	52.07 ± 2.08	34.37 ± 9.8	0	3.64	0.61	0.40	0
Human	Plasma (n = 12)	–	–	–	28.0 ± 2.5	36.2 ± 8.5	–	–	–	1.29
	Centre (n = 25)	2.52 ± 0.52	5.9 ± 0.93	4.11 ± 0.33	0	0	2.34	0.70	0	–
	Intermediate (n = 25)	1.99 ± 0.27	6.9 ± 1.01	2.1 ± 0.27	1.55 ± 0.40	0	3.47	0.30	0.22	0
	Periphery (n = 25)	0.81 ± 0.18	1.82 ± 0.34	0.48 ± 0.06	14.1 ± 3.64	0	2.25	0.26	7.75	0
	Iris (n = 11)	1955.55 ± 78.6	4079.25 ± 89.0	3347.27 ± 51.3	11936.14 ± 22.4	0	2.08	0.82	2.93	0
	Aqueous (n = 7)	11.98 ± 2.25	36.71 ± 4.95	26.12 ± 5.82	23.65 ± 5.91	0	3.06	0.71	0.64	0

**Centre, Intermediate and Periphery** relate to corneal segments; L-3,4-dihydroxyphenylalanine (**DOPA**), dopamine (**DA**), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (**DOPAC**), noradrenaline (**NA**), adrenaline (**AD**); values are means ± SEM (pmol/g for cornea and iris and nmol/L for aqueous humour and plasma) except for ratios.



**Fig. 2.** a and b – Catecholamine concentration in the different segments of rabbit (2a) and human (2b) corneas.

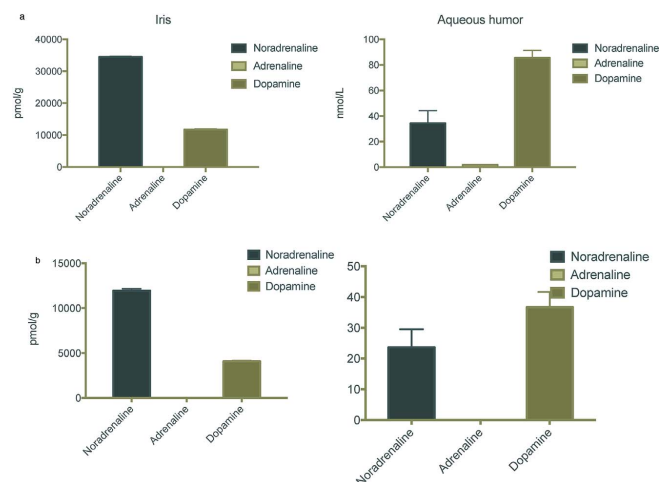


Fig. 3. a and b - Catecholamine concentration in the iris and aqueous humour of rabbit (3a) and human (3b) eyes.

( $n = 45$ ): the AD/NA ratio was 0.04 ( $P < .0001$ ) in the **centre**, 0.17 ( $P = .0002$ ) in the **intermediate** segment and 0.04 ( $P < .0001$ ) in the **periphery**. Levels of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were also found in all corneal segments (please refer to Table 1 and Fig. 2a).

In the **iris** ( $n = 33$ ) and **aqueous humour** ( $n = 33$ ) NA was detected but not AD, giving an AD/NA ratio of zero (high statistical significance;  $P < .0001$  for the iris and  $P = .0015$  for the aqueous). Levels of DOPA, DA and DOPAC were also detected (Table 1 and Fig. 3a).

Venous **plasma** concentrations ( $n = 12$ ) were lower for NA ( $28.0 \pm 2.5$  nmol/L) than for AD ( $36.2 \pm 8.5$  nmol/L), with an AD/NA ratio of 1.29 (not significant,  $P = .36$ ) (Table 1).

Also statistically significant were the differences between: 1) DA versus NA and AD concentrations in the central ( $P < .0001$ ) and intermediate ( $P < .0001$ ) corneal segments; 2) NA, AD and DA concentrations in the peripheral corneal segments (all  $P < .0001$  except for NA vs. DA  $P = .0197$ ), in the iris ( $P < .0001$ ) and in the aqueous humour (all  $P < .0001$  except for NA vs. AD  $P = .0020$ ); 3) NA concentrations in peripheral corneal segments versus those in either central ( $P < .0001$ ) or intermediate corneal segments ( $P < .0001$ ); 4) DA concentrations in peripheral corneal segments versus those in either central ( $P < .0001$ ) or intermediate corneal segments ( $P < .0001$ ).

### 3.3. HPLC-ED assay of catecholamine content - Human

NA was identified only in the **intermediate** and **peripheral** corneal segments ( $n = 25$ ). No AD was found in any of the corneal segments (AD/NA ratio of zero;  $P = .0003$ ). Concentrations of DOPA, DA and DOPAC were found in all corneal segments (Fig. 2b).

In the **iris** ( $n = 11$ ) NA was found but not AD (AD/NA ratio of zero;  $P < .0001$ ). Also, in the **aqueous humour** ( $n = 7$ ) NA was present but no AD was found (AD/NA ratio of zero;  $P = .0039$ ). Levels of DOPA, DA and DOPAC were detected in both iris and aqueous samples (Table 1 and Fig. 3b).

Mean human venous **plasma** concentration of catecholamines measured in supine resting adults, as reported elsewhere in the scientific literature, were considered for the sake of comparison (Jason Eliot et al., 1980; Peuler and Johnson, 1977).

Statistically significant were the differences between: 1) DA versus NA and AD concentrations in the central ( $P < .0001$ ) and intermediate ( $P < .0001$ ) corneal segments; 2) NA versus AD ( $P < .0001$ ) and DA

( $P = .0003$ ) concentrations in the peripheral corneal segments; 3) NA, AD and NA concentrations in the iris ( $P < .0001$ ); 4) AD versus NA ( $P = .0039$ ) and DA ( $P < .0001$ ) concentrations in the aqueous humour; 5) NA concentrations in peripheral corneal segments versus those in either central ( $P < .0001$ ) or intermediate corneal segments ( $P = .0002$ ); 6) DA concentrations in peripheral corneal segments versus those in either central ( $P < .0001$ ) or intermediate corneal segments ( $P < .0001$ ).

### 3.4. Cocaine-sensitive uptake of radio-labelled noradrenaline - Rabbit

All corneal segments and **iris** tissue ( $n = 28$ ) showed loading with 3H-NA. Concentrations of 3H-NA in the **cornea** in the absence of cocaine increased from the centre to the periphery. These differences in loading between corneal segments were statistically significant (Central vs. Intermediate  $P = .0015$ ; Intermediate vs. Peripheral  $P < .0001$ , Central vs. Peripheral  $P < .0001$ ). Incubation with cocaine resulted in a decreased 3H-NA loading and subsequent measured concentrations in both cornea and iris. The comparison of 3H-NA loading before and after cocaine revealed a statistically significant difference only in the **peripheral** corneal segment ( $P < .0001$ ) and in the **iris** ( $P < .0001$ ) (Table 2 and Fig. 4a).

### 3.5. Cocaine-sensitive uptake of radio-labelled noradrenaline - Human

In the absence of cocaine, only the **peripheral** corneal segments and **iris** tissue ( $n = 16$ ) showed loading with 3H-NA. Such discrepancy

Table 2  
Cocaine-sensitive uptake of radio-labelled noradrenaline (3H-NA).

		No cocaine	Cocaine	P value
Rabbit ( $n = 28$ )	Centre	$7.11 \pm 0.53$	$7.13 \pm 0.82$	$> .9999$
	Intermediate	$15.29 \pm 1.05$	$14.83 \pm 1.70$	$> .9999$
	Periphery	$31.17 \pm 2.58$	$13.48 \pm 1.09$	$< .0001^*$
	Iris	$567.76 \pm 42.22$	$29.17 \pm 2.88$	$< .0001^*$
Human ( $n = 16$ )	Centre	0	0	–
	Intermediate	0	0	–
	Periphery	$2.06 \pm 0.29$	$0.86 \pm 0.05$	$.0003^*$
	Iris	$11.79 \pm 0.66$	$0.81 \pm 0.07$	$< .0001^*$

Centre, Intermediate and Periphery relate to corneal segments; values are means  $\pm$  SEM and express concentration of 3H-NA in pmol/g; \*denotes statistical significance.

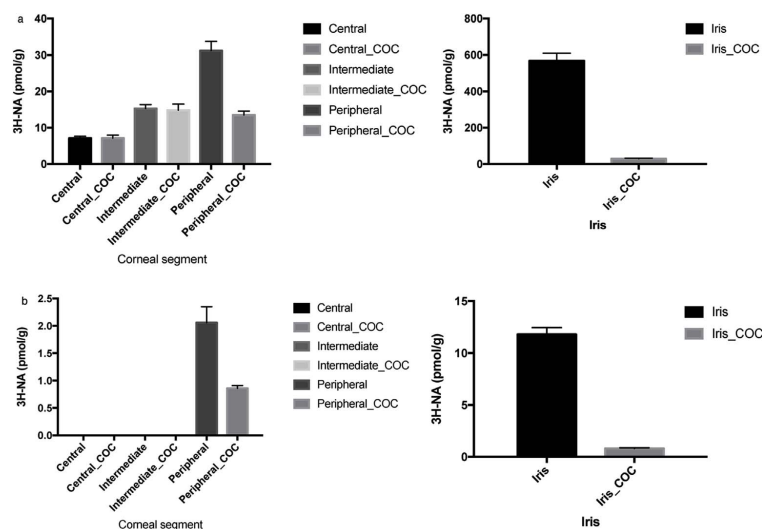


Fig. 4. a and b – 3H-NA concentration in the different corneal segments and in the iris of rabbit (2a) and human (2b) eyes.

between corneal segments was statistically significant: Intermediate vs. Peripheral  $P < .0001$  and Central vs. Peripheral  $P < .0001$ . After incubation with cocaine reduction in measured concentrations of 3H-NA was observed in both the peripheral cornea and the iris. The aforementioned differences in 3H-NA loading before and after cocaine were statistically significant:  $P = .0003$  for the peripheral corneal segment and  $P < .0001$  for the iris (Table 2 and Fig. 4b).

#### 4. Discussion

##### 4.1. Characterisation of human and rabbit corneas

We found that rabbit and human corneas share a similar mean endothelial cell density as measured by specular microscopy. Mean central ultrasonic pachymetry was also similar, although such values do not correlate well with *in vivo* pachymetry as corneal overhydration and edema usually ensue from preservation in the storage medium (Lindstrom et al., 1992). As it is well-known from keratoplasty, corneal pachymetry is usually restored after transplantation as the edema clears with improving endothelial cell function *in vivo* (Lass et al., 2010). Although useful for comparison, no *in vivo* measurements were unfortunately possible.

##### 4.2. HPLC-ED assay of catecholamine content

DA is produced from DOPA by the action of aromatic L-amino acid decarboxylase (Lovenberg et al., 1962) and is the first catecholamine in the synthetic pathway and by itself biologically active and stored in dopaminergic nerves. DA has two main metabolic destinations: conversion to NA by the action of dopamine-beta-hydroxylase or oxidation to DOPAC and hence loss of biologic activity along with subsequent metabolism (Marsden, 2009). NA is the principal neurotransmitter produced and released by sympathetic nerves and these are therefore assumed to be the main reservoirs of NA in the body (Adrian et al., 1932; Smith, 1973). In some tissues (e.g. the adrenal medulla), NA is further converted to AD by the action of phenylethanolamine-N-methyltransferase and released in the systemic circulation where it is mainly responsible for sympathetic endocrine actions (Ciaranello, 1978).

Active synthesis is suggested when the ratio between an enzymatic end product and its substrate is found to be higher than 1, that is, the chemical equilibrium is shifted towards the end product; the reverse is true for ratios lower than 1, which suggest a stall in production. Those are the reasons supporting our calculation of ratios for a clearer interpretation of the results. In the present work, we set out to determine if corneal NA is mostly of neuronal origin.

Overall, we found catecholamine levels to be about one log unit lower in the human cornea, and this is in accordance with published data suggesting a more modest expression of sympathetic pathways in the human cornea when compared to other animals (Ehinger, 1971; Müller et al., 2003; Toivanen et al., 1987).

In both rabbit and human eyes, DA was found to be the most abundant catecholamine in the central and intermediate segments of the cornea, whilst in the peripheral segments NA was dominant.

Moreover, we found a concentration gradient for NA decreasing from the corneal periphery towards the centre. In fact, it is only in the peripheral segments that there seems to be active synthesis of NA, as evidenced by a NA/DA ratio higher than 1 (actually of 7.75 in humans). In contrast, no such gradient was found for DA nor AD (in rabbit corneas, both amines are more concentrated in the intermediate segment with the lowest DA levels in the periphery and the lowest AD levels in the centre; in human corneas, the same is true for DA, but no AD was detected) (Fig. 5a and b). A low AD/NA ratio in all corneal segments suggests that synthesis of AD is not an active process. That is, our finding of low but measurable levels of AD in the rabbit cornea may reflect vestigial expression of phenylethanolamine-N-methyltransferase by some corneal cell types (Evinger, 1997), although not playing a physiologically important role. In humans, no such mechanism seems to exist. Also, a hypothetical contribution of the limbal blood vessels as a source of catecholamines would produce higher levels of AD in the peripheral cornea and a similar gradient to NA, but this is clearly refuted by our data. The existence of NA in the aqueous humour cannot explain the NA concentration gradient in the cornea as the homogenous distribution of this fluid to the back corneal surface would produce no such gradient. On the other hand, the presence of catecholamines in human tears has been described: NA and AD were detected but no DA was found (Trope and Rumley, 1984). The tear film is known to be wider in the periphery and further displaced in ocular surface diseases

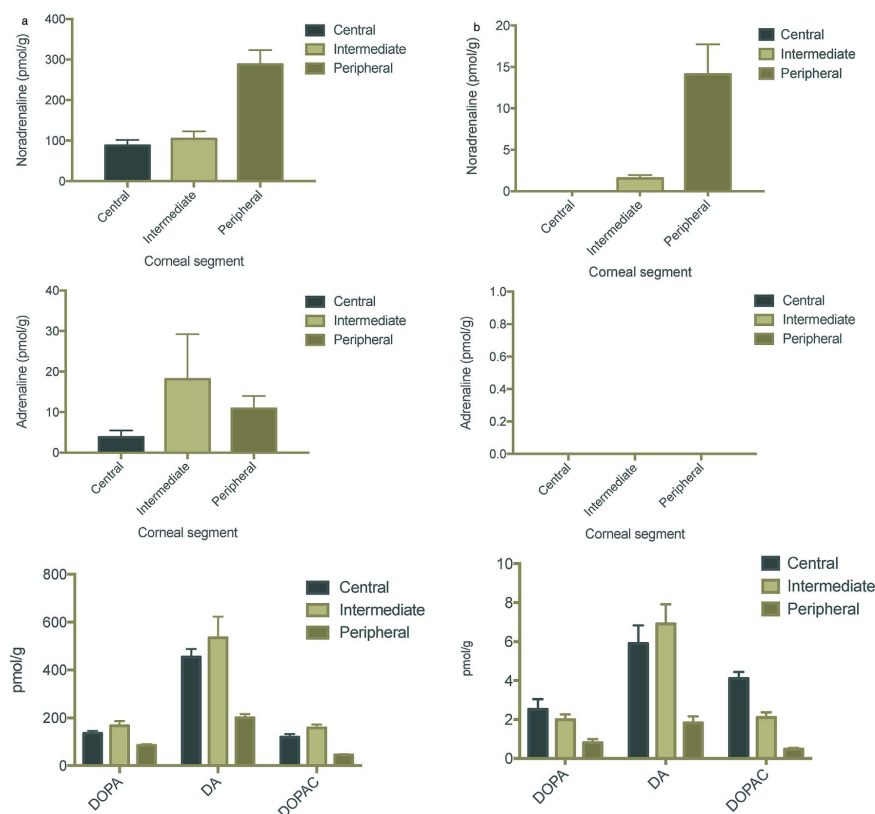


Fig. 5. a and b - Distribution of concentrations for each amine per corneal segment in rabbit (5a) and human (5b) corneas. Note the concentration gradient observed only for NA (decreasing from the periphery towards the centre).

(Lakshmi Prabha, 2014). This however would not explain selective peripheral accumulation of only NA but not AD nor the presence of DA as found in our data, nor would it affect exogenous 3H-NA loading and subsequent reduction by cocaine. Overall, our data support a corneal nerve origin for NA.

The iris is part of the anterior uveal tract and well-known for its sympathetic innervation of the dilator pupillae muscle responsible for mydriasis (Kessler et al., 1983). It is therefore a suitable model for assessing catecholamine synthesis, storage and release and thus an overall marker of sympathetic activity in physiologic and experimental conditions. In this regard, we found NA to be the most abundant amine in the irides of both rabbits and humans, about three times higher than DA, and no AD was detected at all. The ratios DA/DOPA of about 2.5, DOPAC/DA of about 0.75 and NA/DA of about 3 suggest an active DA production that is chiefly directed to the synthesis of NA as the final catecholamine in both species, with no further synthesis of AD.

In the aqueous humour, concentration of DA is roughly twice that of NA and no AD was found, both in rabbits and humans. Catecholamine levels in the aqueous humour have to be interpreted in terms of their possible origin: the ciliary body responsible for aqueous secretion (Cole, 1977, 1966; To et al., 2002) or the sympathetic nerves in the aqueous-bathed iris stroma. We believe the latter to be more likely, as this better explains the higher concentration of the neuronal catecholamines (DA and NA), probably released from the nerves in the

iris (either by exocytosis or passive diffusion), and the absence of AD, the main plasma catecholamine, unable to traverse the blood-ocular barrier. The fact that aqueous levels of DA are higher than those of NA, whilst in the iris is the other way around, probably relates to the vestigial presence of soluble dopamine-beta-hydroxylase for minor DA-NA conversion in the aqueous (evidenced by a low NA/DA ratio of roughly 0.5 in both rabbits and humans), as this enzyme is known to be located inside vesicles in the sympathetic nerves and may be released by exocytosis (Lamoureux et al., 1987; Weinshilboum and Axel, 1971).

The aforementioned set of results suggest that the peripheral cornea is acting like a NA-producing tissue, very much like the iris (namely the iridian sympathetic nerves, for the sake of precision). Thus, two possible explanations are admissible: it could be due to the presence of peripherally located sympathetic nerves, or to intrinsic corneal adrenergic mechanisms, and both explanations are in accordance to evidence already cited.

Given our data in rabbits and in humans, our main hypothesis would be that NA responsible for the activation of corneal adrenoceptors is mostly of neuronal origin.

To test this hypothesis further, we performed an assay of cocaine-sensitive uptake of radio-labelled noradrenaline.

The physiological basis for this assay is that neuronal uptake is the principal mechanism responsible for NA removal from receptor sites and hence for its termination of action. Such process works for both

endogenous (DA, NA, AD) and exogenous catecholamines such as radio-labelled NA (3H-NA) and thus providing a means for its quantification. Cocaine is a potent inhibitor of neuronal uptake by blocking the NA transporter and subsequent loading with 3H-NA.

First of all, in the absence of cocaine, a gradient in 3H-NA loading was found with higher levels occurring in the peripheral cornea (almost 5 times higher than in the central rabbit cornea; in humans, loading occurred only in the peripheral corneal segments). Irides of both species showed the highest loading with 3H-NA, as expected.

We also found that incubation with cocaine resulted in a marked decrease in 3H-NA loading in the peripheral segment of the cornea (suggesting a gradient) and in the iris of both species. 3H-NA loading in the central and intermediate segments of the rabbit cornea was not sensitive to cocaine, that is, 3H-NA loading is not reduced by cocaine and therefore different cell types other than neurons may have a higher relative expression in these segments.

Reduction in 3H-NA loading after incubation with cocaine demonstrates the presence of functional sympathetic nerves in the cornea. Such phenomenon is also expectedly present in the iris, allowing this tissue to act as a control and thus validating the corneal data. These results provide clear evidence to the neuronal origin of NA in the cornea albeit not excluding minor non-neuronal sources.

Controversy exists, in mammals, regarding the significant inter-species differences in innervation density. Dense sympathetic innervation (10–15% of the total corneal innervation) has been described in rabbit corneas (Laties and Jacobowitz, 1966; Marfurt et al., 1989; Tervo and Palkama, 1978), but in primate (humans included) corneas sympathetic fibres were deemed to be scarcer (Ehinger, 1971; Ehinger and Sjöberg, 1971; Müller et al., 2003; Toivanen et al., 1987). As well as this may indeed be true, there is nevertheless an important functional contribution from these nerves that mustn't be underestimated, as our human-rabbit comparison clearly put in evidence.

Age and gender are key factors affecting corneal nerve function (Dvorscak and Marfurt, 2008; Müller et al., 2003), although they seem to relate more to sensory nerves and dry eye disease. While some authors had suggested overall nerve density and orientation does not appear to be affected by these variables (Erie et al., 2005; Hoşal et al., 2005), it has been shown that *in vivo* corneal confocal microscopy underestimates several of the corneal sub-basal nerve plexus parameters when compared with *ex vivo* immunohistochemical staining (Kowtharapu et al., 2017). Nevertheless, recent data using confocal microscopy coupled with specific software analysis concluded that older age, diabetes mellitus and higher level of HbA1c were associated with a significant reduction in corneal sub-basal nerve plexus morphology (Batawi et al., 2017). Donor age and gender were unfortunately unavailable to us as we were barred by our Ethics Committee to access information from donors (under the terms of Portuguese law, access to donor data is authorized only for the clinical purpose of transplantation and not for research, unless informed consent is specifically obtained for that matter in life). Moreover, death-to-preservation time for the human donor corneas was also unavailable, rendering us unable to account for eventual post-mortem changes related to the degeneration of the corneal nerves and the viability of the sympathetic NA transporter.

Besides the demonstration of the neuronal origin of NA, the existence of a loading gradient and an analogous gradient in loading reduction after cocaine suggests that sympathetic nerves follow a topographical pattern unlike that of sensory nerves (Marfurt et al., 2010), with a higher density of sympathetic terminals in the peripheral cornea. As a cardinal rule in biology, structure usually correlates and evolves with function.

Additional studies correlating functional with morphological characterisation of sympathetic nerves in order to clarify their relation to intrinsic sympathetic mechanisms would be welcome.

## 5. Conclusions

There is a concentration gradient for NA decreasing from the corneal periphery towards the centre. In contrast, no such gradient exists for AD. Moreover, NA is more abundant than AD in all corneal segments, whereas in the plasma AD predominates. The suggestion that corneal NA is mostly of neuronal origin is supported by the fact that incubation with cocaine resulted in a marked decrease in 3H-NA loading in the peripheral segment of the cornea and in the iris compared to controls in the absence of cocaine. Reduction in 3H-NA loading after incubation with cocaine demonstrates the presence of sympathetic nerves in the cornea. The occurrence of the same phenomenon in the iris allows this tissue to act as a control and validate the corneal data. Evidence is thus provided of a major neuronal origin of NA in the cornea albeit not excluding minor non-neuronal sources. The existence of a loading gradient and an analogous reduction after cocaine suggests that corneal sympathetic nerves are topographically arranged in a way distinct from that of sensory nerves, with a higher density of sympathetic fibres in the peripheral cornea.

## Acknowledgements

Maria-Augusta Vieira-Coelho, MD, PhD.  
Joana Afonso, ENG.  
Mónica Moreira-Rodrigues, MD, PhD.  
Patrício Soares-da-Silva, MD, PhD.  
Armando Lemos, PhD, Margarida Duarte-Araújo, MD, PhD.  
Sociedade Portuguesa de Oftalmologia | Portuguese Society of Ophthalmology.

## References

- Adrian, D., Bronk, D.W., Phillips, G., Adrian, E.D., 1932. Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J. Physiol.* 74, 115–133. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1932.sp002832>.
- Batawi, H., Shalabi, N., Joag, M., Koru-Sengul, T., Rodriguez, J., Green, P.T., Campigotto, M., Karp, C.L., Galor, A., 2017. Sub-basal corneal nerve plexus analysis using a new software technology. *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 0, 1. <http://dx.doi.org/10.1097/ICL.0000000000000375>.
- Ciaranello, R.D., 1978. Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase. *Biochem. Pharmacol.* 27, 1895–1897. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(78\)90002-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(78)90002-3).
- Cole, D.F., 1977. Secretion of the aqueous humour. *Exp. Eye Res.* 25, 161–176. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835\(77\)80015-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835(77)80015-8).
- Cole, D.F., 1966. Aqueous humour formation. *Doc. Ophthalmol.* 21, 116–238. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00184135>.
- Dvorscak, L., Marfurt, C.F., 2008. Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 910–916. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07.1324>.
- Ehinger, B., 1971. A comparative study of the adrenergic nerves to the anterior eye segment of some primates. *Zeitschrift für Zellforsch. und mikroskopische Anat.* 116, 157–177. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00331259>.
- Ehinger, B., 1966. Connections between adrenergic nerves and other tissue components in the eye. *Acta Physiol. Scand.* 67, 57–64. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1966.tb03287.x>.
- Ehinger, B., Sjöberg, N.O., 1971. Development of the ocular adrenergic nerve supply in man and Guinea-pig. *Zeitschrift für Zellforsch. und mikroskopische Anat.* 118, 579–592. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00324622>.
- Erie, J.C., McLaren, J.W., Hodge, D.O., Bourne, W.M., 2005. The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea* 24, 705–709. <http://dx.doi.org/10.1097/01.ico.0000154387.51355.39>.
- Evinger, M.J., 1997. Determinants of phenylethanolamine-N-methyltransferase expression. *Adv. Pharmacol.* 42, 73–76. [http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60699-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60699-7).
- Ghoshawala, S.Y., Mannis, M.J., Pullar, C.E., Rosenblatt, M.I., Isseroff, R., 2008.  $\beta_2$ -Adrenergic receptor signaling mediates corneal epithelial wound repair. 49, 1857–1863. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.07-0925>.
- Grueb, M., Bartz-Schmidt, K.U., Rohrbach, J.M., 2008. Adrenergic regulation of cAMP/protein kinase A pathway in corneal epithelium and endothelium. *Ophthalmic Res.* 40, 322–328. <http://dx.doi.org/10.1159/000150446>.
- Guimaraes, S., Osswald, W., 1969. Adrenergic receptors in the veins of the dog. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 133–140.
- Hoşal, B.M., Ornek, N., Zilelioğlu, G., Elhan, A.H., 2005. Morphology of corneal nerves and corneal sensation in dry eye: a preliminary study. *Eye (Lond)* 19, 1276–1279. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.eye.6701760>.
- Jason Eliot, R., Lam, R., Leake, R.D., Hobel, C.J., Fisher, D.A., 1980. Plasma catecholamine concentrations in infants at birth and during the first 48 hours of life. *J. Pediatr.*



- 96, 311–315. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(80\)80836-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(80)80836-5).
- Jones, M.A., Marfurt, C.F., 1996. Sympathetic stimulation of corneal epithelial proliferation in wounded and nonwounded rat eyes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2535–2547.
- Kessler, J.A., Bell, W.O., Black, I.B., 1983. Interactions between the sympathetic and sensory innervation of the iris. *J. Neurosci.* 3, 1301–1307.
- Klyce, S.D., Beuerman, R.W., Crosson, C.E., 1985. Alteration of corneal epithelial ion transport by sympathectomy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 434–442.
- Kowtharapu, B.S., Winter, K., Marfurt, C., Allgeier, S., Köhler, B., Hovakimyan, M., Stahnke, T., Wree, A., Stachs, O., Guthoff, R.F., 2017. Comparative quantitative assessment of the human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo confocal microscopy and histological staining. *Eye* 31, 481–490. <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2016.220>.
- Lakshmi Prabha, J., 2014. Tear secretion - a short review. *J. Pharmaceut. Sci. Res.* 6, 155–157.
- Lamoureux, A., Vigny, a, Faucon Biguet, N., Darmon, M.C., Franck, R., Henry, J.P., Mallet, J., 1987. The primary structure of human dopamine-beta-hydroxylase: insights into the relationship between the soluble and the membrane-bound forms of the enzyme. *EMBO J.* 6, 3931–3937.
- Lass, J.H., Sugar, A., Benetz, B.A., Beck, R.W., Dontchev, M., Gal, R.L., Kollman, C., Gross, R., Heck, E., Holland, E.J., Mannis, M.J., Raber, I., Stark, W., Stulting, R.D., 2010. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960) 128, 63–69. <http://dx.doi.org/10.1001/archophthol.128.1.63>.
- Lates, A.M., Jacobowitz, D., 1966. A comparative study of the autonomic innervation of the eye in monkey, cat, and rabbit. *Anat. Rec.* 383–395.
- Lindstrom, R.L., Kaufman, H.E., Skelnik, D.L., Laing, R.A., Lass, J.H., Musch, D.C., Trousdale, D., Reinhart, W.J., Burris, T.E., Sugar, A., Davis, R.M., Hirokawa, K., S M I T H, T., Gordon, J.F., 1992. Optisol corneal storage medium. *Am. J. Ophthalmol.* 114, 345–356. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)71803-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9394(14)71803-3).
- Lovenberg, W., Weissbach, H., Udenfriend, S., 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 237, 89–93.
- Marfurt, C.F., Cox, J., Deek, S., Dvorscak, L., 2010. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp. Eye Res.* 90, 478–492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2009.12.010>.
- Marfurt, C.F., Ellis, L.C., 1993. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *J. Comp. Neurol.* 336, 517–531. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903360405>.
- Marfurt, C.F., Kingsley, R.E., Echtenkamp, S.E., 1989. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 461–472.
- Marsden, C.A., 2009. Dopamine: the rewarding years. *Br. J. Pharmacol.* 147, S136–S144. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706473>.
- Morgan, C., DeGroat, W.C., Jannetta, P.J., 1987. Sympathetic innervation of the cornea from the superior cervical ganglion. An HRP study in the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20, 179–183.
- Moura, D., Azevedo, I., Guimarães, S., 1990. Differential distribution in, and release from, sympathetic nerve endings of endogenous noradrenaline and recently incorporated catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342, 153–159. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00166958>.
- Müller, L.J., Marfurt, C.F., Kruse, F., Tervo, T.M.T., 2003. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76, 521–542. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00050-2).
- Peuler, J.D., Johnson, G.A., 1977. Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci.* 21, 625–636. [http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90070-4](http://dx.doi.org/10.1016/0024-3205(77)90070-4).
- Pullar, C.E., Zhao, M., Song, B., Pu, J., Reid, B., Ghoghawala, S., McCaig, C., Isseroff, R.R., 2007. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J. Cell. Physiol.* 211, 261–272. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20934>.
- Schömig, E., Trendelenburg, U., Azevedo, I., Moura, D., 1991. The steady-state concentration gradient for 3H-noradrenaline generated by uptake1 in the extracellular space of the rat vas deferens incubated with this amine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344, 41–46. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00167381>.
- Shaheen, B.S., Bakir, M., Jain, S., 2014. Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59, 263–285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.09.002>.
- Smith, A.D., 1973. Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves. *Br. Med. Bull.* 29, 123–129. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a070981>.
- Soares-da-Silva, P., Fernandes, M.H., Pestana, M., Vieira-Coelho, M. a, Fernandes, M.H., Albino-Teixeira, A., 1995. Assessment of renal dopaminergic system activity in the nitric oxide-deprived hypertensive rat model. *Br. J. Pharmacol.* 114, 1403–1413.
- Templeton, A., Nguyen, G., Ash, J.D., Straub, R.H., Carr, D.J.J., 2008. Chemical sympathectomy increases susceptibility to ocular Herpes Simplex Virus type 1 infection. *J. Neuroimmunol.* 197, 37–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jumov.2008.02.015>.
- Changes.
- Tervo, T., Palkama, A., 1978. Innervation of the rabbit cornea. A histochemical and electron-microscopic study. *Acta Anat. (Basel)* 102, 164–175.
- To, C.H., Kong, C.W., Chan, C.Y., Shahidullah, M., Do, C.W., 2002. The mechanism of aqueous humour formation. *Clin. Exp. Optom.* <http://dx.doi.org/10.1111/j.1444-0938.2002.tb02384.x>.
- Toivanen, M., Tervo, T., Parranen, M., Vannas, A., Hervonen, A., 1987. Histochemical demonstration of adrenergic nerves in the stroma of human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 398–400.
- Trope, G.E., Rumley, A.G., 1984. Catecholamine concentrations in tears. *Exp. Eye Res.* 39, 247–250. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4835\(84\)90012-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4835(84)90012-5).
- Walkenbach, R.J., Ye, G.S., Reinach, P.S., Boney, F., 1991. Alpha1-Adrenoceptors in human corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 3067–3072.
- Weinshilboum, R., Axel, J., 1971. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ. Res.* 28, 307–315. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.28.3.307>.
- Yasukura, T., Inoue, M., Irie, T., Hara, M., Mikami, Y., Zeng, X.T., Mikami, T., Omori, K., Minato, A., Uyama, M., 1995. Adrenergic receptor-mediated Cl<sup>-</sup> transport in rabbit corneal endothelial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 67, 315–320.
- Zamir, E., Chowers, I., Banin, E., Frucht-Pery, J., 1999. Neurotrophic corneal endothelial failure complicating acute Horner syndrome. *Ophthalmology* 106, 1692–1696. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90362-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90362-7).



Regulation of Corneal Noradrenaline Release and Topography of Sympathetic  
Innervation: Functional Implications for Adrenergic Mechanisms in the Human  
Cornea





## Regulation of corneal noradrenaline release and topography of sympathetic innervation: Functional implications for adrenergic mechanisms in the human cornea



Luis Figueira<sup>a,b,c,\*</sup>, Catarina Janeiro<sup>a</sup>, Fatima Ferreira<sup>c,d</sup>, Paula Serrao<sup>a,c</sup>, Sara Perestrelo<sup>b</sup>, Fernando Falcao-Reis<sup>b</sup>, Paulo Correia-de-Sa<sup>c,d</sup>, Daniel Moura<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine of the University of Porto, Porto, Portugal

<sup>b</sup> Department of Ophthalmology, Hospital S. João, Porto, Portugal

<sup>c</sup> Center for Drug Discovery and Innovative Medicines (MedInUP), University of Porto, Porto, Portugal

<sup>d</sup> Laboratory of Pharmacology and Neurobiology, Department of Immunophysiology and Pharmacology, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), University of Porto, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cornea  
Sympathetic nerves  
Regulation of noradrenaline release  
Electrically-evoked overflow  
Fractional rate of loss  
Alpha-2 adrenoceptors  
Adrenergic mechanisms  
Neuronal topography  
Rabbit  
Human

### ABSTRACT

Having established a main neuronal origin for noradrenaline (NA) in the cornea, we set out to study the physiologic determinants of its release and to correlate functional findings with sympathetic nerve density and overall topography. Whole corneas were obtained from 3 to 4 month-old rabbits and human donors. Study of prejunctional effects was carried out after incubation with radiolabelled NA (3H-NA). Corneas were superfused with warm aerated amine-free medium with cocaine and hydrocortisone to block subsequent neuronal and extraneuronal NA uptake. Samples were collected every 5 min. Four periods of transmural electrical stimulation were applied to assess evoked release of 3H-NA in the absence and in the presence of alpha-2 adrenoceptor antagonists. Catecholamines were extracted with alumina from the superfusate collected and quantified by high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED). Corneal nerve morphology was studied by immunofluorescence staining with monoclonal antibodies and subsequent confocal microscopy. Corneal lamellar sections were also produced (epithelium, stroma, endothelium) and endogenous NA and adrenaline (AD) were quantified by HPLC-ED. Results are means  $\pm$  SEM. ANOVA and t-tests were used for statistical analysis. Ratios between enzymatic end products and their substrates were calculated. In both rabbit and human corneas, electrical stimulation increased the outflow of 3H-NA per minute and per shock. Addition of the alpha-2 adrenoceptor antagonist rauwolscine further increased the electrically-evoked overflow of 3H-NA in a concentration-dependent manner. Immunofluorescence revealed particular staining patterns for sensory and sympathetic fibres, epithelial cells and stromal keratocytes. In human corneal lamellar sections only NA was identified, particularly in the endothelium and epithelium. In the rabbit, concentration of NA was ten times that of AD. Electrically-evoked overflow reflects action potential-induced NA release by sympathetic nerves in the cornea and an alpha-2 adrenoceptor-mediated mechanism for its release is presented. Sympathetic innervation has similar functional relevance in both rabbit and human corneas.

### 1. Introduction

The cornea is a densely innervated tissue (Klyce et al., 1985) known to harbour autonomic fibres apart from sensory fibres (Ehinger, 1966; Marfurt and Ellis, 1993; Toivanen et al., 1987).

Although the different Mammalian species receive variable contributions of corneal nerve fibres from the sympathetic and parasympathetic nervous system, human corneas are considered at the

extreme of this spectrum, since they appear to have a very small proportion of autonomic nerve fibres. The particular role of sympathetic nerves in the cornea is still quite ambiguous.

The presence of catecholamines and adrenoceptors regulating inositol phosphate turnover in human and rabbit corneas was shown before, and proliferation of corneal epithelial cells was found to have double regulation by an adrenergic-off response (cyclic AMP-dependent) and by a muscarinic-on response (cyclic GMP-dependent) (Pullar

\* Corresponding author. Permanent address: Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine of the University of Porto, Alameda Prof. Hernani Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal.

E-mail address: [figueira@med.up.pt](mailto:figueira@med.up.pt) (L. Figueira).

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.05.023>

Received 28 March 2018; Received in revised form 26 April 2018; Accepted 21 May 2018

Available online 24 May 2018

0014-4835/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

et al., 2007; Walkenbach et al., 1991; Yasukura et al., 1995). Particularly, an intrinsic sympathetic system has been suggested upon grounds that adrenergic stimulation in corneal epithelial and endothelial cells leads to activation of PKA via stimulation of adenylyl cyclase, and alpha-2A-adrenoceptor stimulation inhibits PKA activity via inhibition of adenylyl cyclase. This cAMP-PKA pathway is thought to play a role in important corneal functions such as wound healing and overall homeostasis (Ghoghawala et al., 2008; Grueb et al., 2008). In fact, ocular sympathetic nerves were shown to stimulate rat corneal epithelial proliferation under normal physiological conditions and during corneal wound healing, occurring independently of functional interactions with ocular sensory nerves and appearing to be related, at least in part, to the release of noradrenaline (NA) (Jones and Marfurt, 1996; Müller et al., 2003).

A neurotrophic role has been attributed to corneal sympathetic nerves as shown in cases of endothelial decompensation and corneal edema after sympathetic denervation (Zamir et al., 1999), and overall nerve dysfunction is a common pathophysiologic hallmark of different eye diseases and an important cause of corneal blindness (Müller et al., 2003; Shaheen et al., 2014).

Having found a concentration gradient for NA decreasing from the corneal periphery towards the centre (Figueira et al., 2018, 2012), we presented additional evidence that corneal NA is mostly of neuronal origin (rather than from intrinsic corneal production) upon observing a marked decrease in radiolabelled tritiated NA (3H-NA) loading in the peripheral segment of the cornea after inhibiting neuronal NA uptake with cocaine. The additional finding of a loading gradient for 3H-NA (higher loading and loading reduction after cocaine in the periphery) suggested that sympathetic nerves have a distinct topographical distribution to that of sensory nerves, with a higher density of sympathetic terminals in the peripheral cornea (Figueira et al., 2018).

In the present work, our objectives are to assess prejunctional regulation of NA release in the cornea, namely the presence and function of alpha-2 autoreceptors, to determine catecholamine levels in corneal lamellar sections (epithelium, stroma and endothelium) and to correlate these findings with a morphological characterization of sympathetic nerves.

## 2. Material and methods

**Compliance with requirements for studies using animals.** The rabbit's cornea and respective innervation has been extensively studied and is regarded as a fair template for human corneal anatomy and physiology (Klyce et al., 1985; Tervo and Palkama, 1978; Walkenbach et al., 1991; Yasukura et al., 1995).

All animal care and experimental protocols were carried out in accordance with the European Directive 63/2010/EU, transposed to the Portuguese legislation by the Directive Law 113/2013. The study protocol received approval by the Ethics Committee for Health of the Faculty of Medicine of the University of Porto.

Whole eyes were obtained from New Zealand White male rabbits, aged 3–4 months and weighting between 3 and 5 kg, lodged in the vivarium of the Faculty of Medicine of the University of Porto. Only animals euthanized because of unrelated experimental protocols were used in order to avoid sacrifice for the sole purpose of obtaining the eyes. Animals were housed in front-opening, stainless steel cages with solid bottom flooring with small holes for excreta passage, at a controlled temperature of 21 °C and relative air humidity of 60%, with 10–12 air changes per hour.

Animals were euthanized with 400 mg intravenous pentobarbital sodium administered in the marginal ear vein. Standard surgical aseptic principles were observed during eye enucleation. A total number of 48 corneas was obtained.

**Tissue sampling and preparation.** Corneas were harvested by standard pericorneal trephination from 3 to 4 month-old rabbits.

Human corneas were also obtained from the eye bank of Centro

Hospitalar S. João, selected among those rejected for transplantation because of donor-related contraindication (e.g. infectious disease). As well as this may be true regarding systemic donor-related information, only macroscopic normal-looking corneas were selected. A total of 23 corneas were deemed usable by the aforementioned standards.

Tissues were preserved in a storage medium developed for human corneas (Optisol GS<sup>®</sup>, Bausch&Lomb, USA) and subsequently stored at 4 °C. Experimental work was carried out in the same day, starting usually within two to three hours after harvesting.

**Study of prejunctional effects** (Guimarães et al., 2004; Moreira-Rodrigues et al., 2014; Moura et al., 1990). Corneas were dissected out, freed of the surrounding sclera and iris and immersed in a modified Krebs–Henseleit solution at 37 °C (Guimaraes and Osswald, 1969) of the following composition (mM): NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 11, ascorbic acid 0.57 and disodium ethylenediamine-tetraacetic acid 0.03, maintained at 37 °C and bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. To increase the accumulation of amines in the sympathetic nerve endings, tissues were preincubated for 30 min with 5 mL of medium containing 1 mmol/l pargyline (to inhibit monoamine oxidase) and 41 µmol/L hydrocortisone (to inhibit extra-neuronal uptake). All drugs (except pargyline) were kept in the medium for the remainder of the experiment.

After preincubation, samples were exposed for 60 min with 0.2 µM radioactive tritiated NA (3H-NA) in the presence of 10 µM tolcapone (catechol-O-methyltransferase inhibitor).

Afterwards, each tissue was mounted in a 4-mL glass chamber and perfused with amine-free medium (aerated and at 37 °C) at a flow rate of 0.8 mL/min. At minute 100, 30 min before electrical stimulation ( $t = 0$  min being the onset of the perfusion), 7.5 µmol/L cocaine was added to the perfusion medium to block subsequent neuronal reuptake of NA (Trendelenburg, 1966). From the 105<sup>th</sup> minute of washout onwards, the superfusion fluid was collected continuously in samples of 5 min. Thereafter, four periods of transmural electrical stimulation (80 mA, 3 Hz, for 40 s; Stimulator II X, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) were applied at minutes 130 (S1), 160 (S2), 190 (S3) and 220 (S4). The first period of electrical stimulation was disregarded and the second, third and fourth ones were considered to assess the evoked release of 3H-NA in the absence (controls) and in the presence of alpha-2 adrenoceptor antagonists.

The outflow measured in the last pre-stimulation sample was taken to represent the spontaneous outflow of 3H-NA in the subsequent samples; it was subtracted from the total outflow determined in stimulation and post-stimulation samples. This overflow was expressed as a fraction of the 3H-NA present in the tissue at the onset of the stimulation (tissue's total amine content was determined at the end of the experiment with addition of the amount of amine collected during superfusion). Total outflow and overflow were also expressed per minute and per shock, so-called electrically-evoked release (Furchgott, 1972; Luchelli-Fortis and L.S., 1975; A. U. Trendelenburg et al., 1997) and serving as a measure of sympathetic nerve density (Potes et al., 2010).

Presynaptic positive feedback effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist rauwolscine on NA release was determined by addition of increasing concentrations: 10 nM 15 min before S2, 30 nM 15 min before S3 and 100 nM 15 min before S4. Overflow ratios obtained after addition of rauwolscine were also calculated as a percentage of the corresponding ratio in controls in which no drug was added. The effect of rauwolscine on the spontaneous outflow of NA was evaluated in similar fashion (Moura et al., 2006).

**Determination of amines in tissues and medium** (Moura et al., 1990). The superfusate collected during each period was acidified with perchloric acid 0.2 M and catecholamines were extracted with alumina as described by Davis (Davis et al., 1981). In brief, aliquots of HClO<sub>4</sub>, in which tissues had been kept were placed in 5 mL conical-base glass vials with 50 mg alumina, and the pH of the samples was adjusted to pH 8.6 by addition of Tris buffer. The adsorbed catecholamines were then eluted from the alumina with 200 µL of 0.2 mol/L HClO<sub>4</sub> on Costar

Spin-X microfilters; 50  $\mu$ L of the eluate was injected into an HPLC (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France) for radioactivity measurement by liquid scintillation counting (liquid scintillation counter 1209 Rackbeta, LKB Wallac, Turku, Finland), after addition of 8 mL of scintillation mixture (OptiPhase “HiSafe” 3, LKB, Loughborough, England).

After the experiment, tissues were kept overnight in 3 mL 0.1 mol/L perchloric acid. Aliquots of the extract were analysed as described for superfusate samples. Under these conditions, total radioactivity in the alumina eluate was considered as corresponding to 3H-NA (Graefe et al., 1973). The lower limit of detection of catecholamines ranged from 350 to 1000 fmol (Soares-da-Silva et al., 1995).

**Study of morphology by immunofluorescence staining and confocal microscopy.** In order to establish a correlation with previous findings, we studied nerve morphology using immunofluorescence staining and confocal microscopy observation.

Rabbit and human corneas were fixed at 4 °C in PLP solution (paraformaldehyde 2%, lysine 0.075 M, sodium phosphate 0.037 M, sodium periodate 0.01 M) for 1 and 2 h, respectively. Following fixation, the preparations were washed three times for 10 min each using 0.1 M phosphate buffer. At the end of the washout period, tissues were cryopreserved in 30% sucrose and stored in a tissue freezing medium at –80 °C. Twenty-micron sections were incubated for 1 h, at room temperature with blocking buffer (foetal bovine serum 10%, serum albumin 1%, Triton X-100 0.5%,  $\text{NaN}_3$  0.05% in PBS) and overnight with the selected primary antibodies (Table 1) diluted in an incubation buffer (foetal bovine serum 5%, serum albumin 1%, Triton X-100 0.3%,  $\text{NaN}_3$  0.05% in PBS) at 4 °C, for 16 h. For double immunostaining, antibodies were combined before application to tissue samples. After washing away unbound primary antibody, the sections were incubated with secondary antibodies (Table 1) in the dark for 2 h, at room temperature. Cross-reactivity of the secondary antibodies was tested in control experiments in which primary antibodies were omitted. Finally, tissue samples were mounted on optical-quality glass slides using VectaShield as antifade mounting media (VectorLabs) and stored in the dark at 4 °C. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; strong affinity for DNA) fluorescent dye was used for staining cellular nuclei. Observations were performed and analysed with a laser-scanning confocal microscope (Olympus FluoView, FV1000, Tokyo, Japan).

**Assay of catecholamine content in corneal lamellar sections.** We performed corneal lamellar dissection to identify NA and adrenaline (AD) levels in the epithelium, stroma and endothelium. In this regard, epithelium was first scrapped with a blunt spatula. Then, after staining with methylene blue, Descemet's membrane was stripped along with overlying endothelium by use of a Sinskey hook in a technique similar to that of human endothelial keratoplasty (Price and Price, 2010). Thus, the remaining corneal tissue would be plain stroma. It must be emphasized that because of the adequate reproducibility reported for the

aforementioned surgical techniques, no histological control of the samples thus obtained was made. The three corneal lamellar sections were subsequently stored in perchloric acid 0.2 M at –80 °C. High pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) was used to quantify endogenous NA and AD, as described above.

**Statistical analysis.** Results are expressed as arithmetic means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Analysis of variance with Tukey correction for multiple comparisons was used to test for differences between unpaired results. Some differences between means were further assessed with the Student's t-test. A probability level of 0.05 or less was considered statistically significant. Statistical software package Graphpad Prism version 7 was used for analysis.

### 3. Results

For ease of reading, values in text are expressed as means only, with the corresponding SEM values to be found in Tables 2 and 3.

**Spontaneous outflow and effect of electrical stimulation on radiolabelled NA release – Rabbit.** In control samples (i.e. in the absence of antagonist and before electrical stimulation), the basal efflux of 3H-NA decreased slowly over time in the cornea (from  $3.44 \times 10^{-1}$  pmol at minutes 105–110 to  $5.35 \times 10^{-2}$  pmol at minutes 245–250). However, the fractional rate of loss per minute remained stable throughout the course of the experiment:  $7.92 \times 10^{-3}$  pmol/g per minute (as measured at minutes 125, 155, 185 and 215) ( $n = 42$ ).

Electrical stimulation (80 mA, 3 Hz, for 40 s) increased the outflow of tritium from corneas preincubated with 3H-NA. The basal efflux of tritium immediately before S2 averaged  $1.24 \times 10^{-1}$  pmol and the overflow of 3H-NA elicited by S2 averaged  $1.24 \times 10^{-2}$  pmol/g (0.34% of the tritium content of the tissue) ( $n = 42$ ).

The fractional rate of loss per minute thus increases during the period of electrical stimulation, averaged  $9.12 \times 10^{-3}$  pmol/g per minute (15.05% increase;  $P = 0.0274$ ) and remains stable during S2, S3 and S4 (as mentioned in “Methods”, S1 was disregarded). It returns to basal levels in the subsequent samples before the next period of stimulation. Specifically, the electrically-evoked overflow (% of tissue tritium) remained approximately constant from S2 to S4: S3/S2, S4/S2 and S4/S3 ratios were 0.95, 1.01 and 1.07 respectively ( $n = 42$ ), all close to 1.

When considering the fractional rate of loss per shock, which expresses the overflow of 3H-NA as a fraction of the tissue content divided by the number of electrical shocks (120), it was found to be fairly consistent among the various periods of electrical stimulation and averaged  $2.95 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock.

**Spontaneous outflow and effect of electrical stimulation on radiolabelled NA release – Human.** In control samples, the basal efflux of 3H-NA decreased slowly over time in the cornea (from  $5.32 \times 10^{-1}$  pmol at minutes 105–110 to  $4.18 \times 10^{-2}$  pmol at minutes

**Table 1**  
Primary and secondary antibodies used for immunofluorescence staining.

Primary antibodies	Code	Host	Dilution	Source
Anti-Dopamine $\beta$ -Hydroxylase (DBH)	orb178863	Goat (gt)	1:150	Biorbyt
Anti-Tyrosine Hydroxylase (TH)	orb18276	Mouse (ms)	1:50	Biorbyt
Anti-Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5)	7863-1004	Mouse (ms)	1:500	Serotec
Anti-Vimentin (Vim)	M0725	Mouse (ms)	1:450	Dako
Anti-Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)	B 64-1	Rabbit (rb)	1:1500	EuroProxima
Anti- $\alpha$ 2a Adrenergic Receptor ( $\alpha$ 2)-FTTC	orb15063	Rabbit (rb)	1:50	Biorbyt
Secondary antibodies	Code	Host	Dilution	Source
Alexa Fluor 488 anti-rb	A-21206	Donkey (dk)	1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 anti-gt	A-11057	Donkey (dk)	1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-ms	A-21202	Donkey (dk)	1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 anti-ms	A-10037	Donkey (dk)	1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor 633 anti-ms	A-21052	Goat (gt)	1:1000	Molecular Probes

**Table 2**  
Effect of prejunctional interventions on radiolabelled NA release.

		Rabbit (n = 42)	difference	P	Human (n = 19)	difference	P
Prior to electrical stimulation	FRL/min	7,92E-03 ± 2,44E-04	15,05% increase	0,0274	8,99E-03 ± 2,55E-04	9,04% increase	0,2667
Electrical stimulation without RW	FRL/min during S	9,12E-03 ± 4,71E-04			9,80E-03 ± 6,74E-04		
	S2 overflow	0,34% of total tissue amine	S3/S2 ratio 0,95	–	0,27% of total tissue amine	S3/S2 ratio 1.81	–
	S3 overflow	0,32% of total tissue amine	S4/S2 ratio 1,01		0,49% of total tissue amine	S4/S2 ratio 1.55	
	S4 overflow	0,34% of total tissue amine	S4/S3 ratio 1,07		0,42% of total tissue amine	S4/S3 ratio 0.86	
Electrical stimulation with RW	FRL/shock	2,95E-05 ± 8,77E-06	same during S2, S3 and S4	–	3,01E-05 ± 3,15E-06	same during S2, S3 and S4	–
	S2 with RW 10 nM						
	overflow	0,37% of total tissue amine	10,01% increase	0,1011	0,31% of total tissue amine	14,52% increase	0,0166
	FRL/shock	8,36E-05 ± 5,39E-06	183,02% increase	0,2325	3,28E-05 ± 1,91E-06	8,93% increase	0,9999
	S3 with RW 30 nM						
	overflow	0,45% of total tissue amine	41,43% increase	0,0001	0,55% of total tissue amine	12,24% increase	0,0001
	FRL/shock	9,51E-05 ± 2,66E-06	222,15% increase	0,1142	7,91E-05 ± 4,47E-06	162,70% increase	0,5016
	S4 with RW 100 nM						
	overflow	0,59% of total tissue amine	74,95% increase	0,0001	0,69% of total tissue amine	64,29% increase	0,0001
	FRL/shock	1,89E-04 ± 4,48E-05	541,51% increase	0,0001	1,08E-04 ± 5,83E-05	259,92% increase	0,1538

Fractional rate of loss (FRL); rauwolsine (RW); electrical stimulation at minute 130 (S1), 160 (S2), 190 (S3) and 220 (S4); values are means ± SEM and express concentration of 3H-NA in pmol/g; some values are percentages (%) or ratios; \* denotes statistical significance ( $P < 0.05$ ).

**Table 3**  
HPLC-ED assay of catecholamine content in corneal lamellae.

		NA	AD	AD/NA ratio
Rabbit	Epithelium (n = 6)	238.96 ± 54.59	19.74 ± 5.92	0.08
	Stroma (n = 6)	48.17 ± 7.80	4.13 ± 1.01	0.08
	Endothelium (n = 6)	525.36 ± 71.57	0	0
Human	Epithelium (n = 4)	9.78 ± 3.75	0	0
	Stroma (n = 4)	2.95 ± 1.02	0	0
	Endothelium (n = 4)	15.22 ± 4.99	0	0

Noradrenaline (NA), adrenaline (AD); values are means ± SEM (pmol/g) except for ratios.

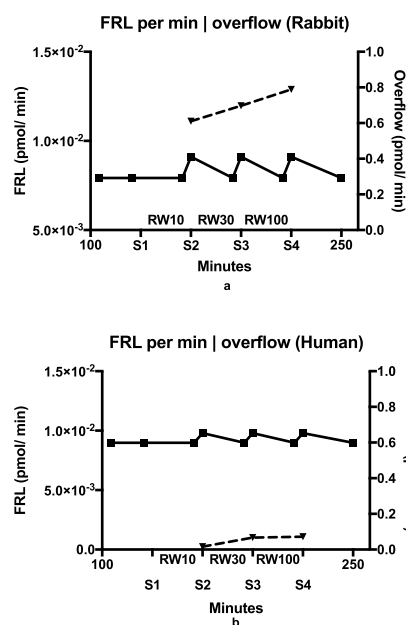
245–250). However, and as in the rabbit cornea, the fractional rate of loss per minute remained stable throughout the course of the experiment:  $8.99 \times 10^{-3}$  pmol/g per minute (as measured at minutes 125, 155, 185 and 215) ( $n = 19$ ).

Electrical stimulation increased the outflow of tritium from corneas preincubated with 3H-NA. The basal efflux of tritium immediately before S2 averaged  $1.47 \times 10^{-1}$  pmol and the overflow of 3H-NA elicited by S2 averaged  $5.00 \times 10^{-3}$  pmol/g (0.27% of the tritium content of the tissue) ( $n = 19$ ).

The fractional rate of loss per minute, as in the rabbit cornea, also increases during the period of electrical stimulation, averaged  $9.80 \times 10^{-3}$  pmol/g per minute (9.04% increase;  $P = 0.2667$ ) and remains stable during S2, S3 and S4. It returns to basal levels in the subsequent samples before the next period of stimulation. Specifically, the electrically-evoked overflow (% of tissue tritium), contrary to the rabbit cornea, showed some variation from S2 to S4: increased to 0.49% after S3 (S3/S2 ratio 1.81) and decreased to 0.42% after S4 (S4/S2 ratio 1.55 and S4/S3 ratio 0.86) ( $n = 19$ ).

When considering the fractional rate of loss per shock in the human cornea, it was nevertheless found to be fairly consistent among the various periods of electrical stimulation and averaged  $3.01 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock.

**Added effect of alpha-2 adrenoceptor antagonism on electrically-induced radiolabelled NA release – Rabbit.** The addition of the alpha-2 adrenoceptor antagonist rauwolsine 15 min before electrical stimulation further increased the electrically-evoked overflow of



**Fig. 1.** Fractional rate of loss per minute (solid line) and overflow (dashed line) of radiolabelled noradrenaline under the effect of electrical stimulation and alpha-2 receptor antagonism in the rabbit (1a) and human (1b) cornea. (FRL – fractional rate of loss; S – stimulation; RW10, 30, 100 – rauwolsine 10 nM, 30 nM, 100 nM).

3H-NA in a concentration-dependent manner (10 nM, 30 nM, 100 nM) (Fig. 1a, dashed line).

It should be noted that the first experiments were performed with increasing rauwolsine concentrations of 30 nM, 100 nM and 300 nM, but saturation consistently occurred at concentrations above 100 nM (data not shown). As such, further experiments were conducted with

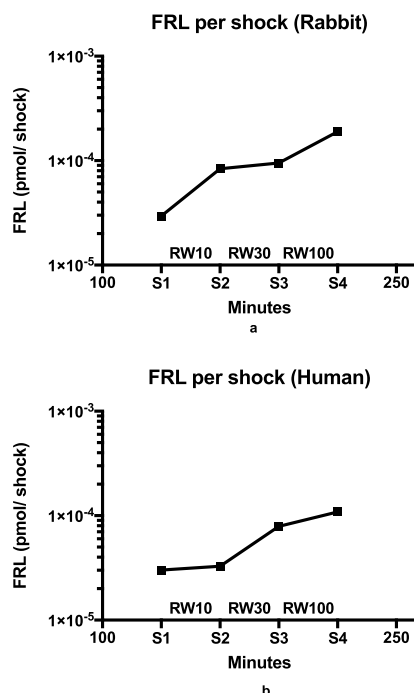


Fig. 2. Fractional rate of loss of radiolabelled noradrenaline per electric shock and the added effect of alpha-2 receptor antagonism in the rabbit (2a) and human (2b) cornea. (FRL – fractional rate of loss; S – stimulation; RW10, 30, 100 – rauwolscline 10 nM, 30 nM, 100 nM).

rauwolscline 10 nM before S2, 30 nM before S3 and 100 nM before S4.

The maximal electrically-evoked overflow verified was 0.59% of tissue's total amine content (74.95% increase;  $P < 0.0001$ ), occurring with a rauwolscline concentration of 100 nM after S4. The overflow values were 0.37% after rauwolscline 10 nM and S2 (10.01% increase;  $P = 0.1011$ ) and 0.45% after rauwolscline 30 nM and S3 (41.43% increase;  $P < 0.0001$ ).

On the contrary, the determination of the fractional rate of loss per minute of 3H-NA in the samples just before S2 (minute 155), S3 (minute 185) and S4 (minute 215) revealed that rauwolscline alone seems not to affect the spontaneous outflow of tritium (i.e. without electrical stimulation), with a mean value of  $7.98 \times 10^{-3}$  pmol/g per minute (Fig. 1a, solid line).

When considering the fractional rate of loss per shock, it was found to increase also in a concentration-dependent manner (Fig. 2a). In this regard, after S2 and with a rauwolscline concentration of 10 nM, the fractional rate of loss increased to  $8.36 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock (183.02% increase;  $P = 0.2325$ ); after S3 and with rauwolscline 30 nM, it increased to  $9.51 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock (222.15% increase;  $P = 0.1142$ ) and after S4 and with rauwolscline 100 nM, it increased to  $1.89 \times 10^{-4}$  pmol/g per shock (541.51% increase;  $P = 0.0001$ ). In this particular analysis, the value considered for S1 denotes the mean value ( $2.95 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock) found in the experiments of electrical stimulation without addition of rauwolscline.

**Added effect of alpha-2 adrenoceptor antagonism on electrically-induced radiolabelled NA release – Human.** As in the rabbit cornea, the addition of rauwolscline 15 min before electrical stimulation further increased the electrically-evoked overflow of 3H-NA in a

concentration-dependent manner (Fig. 1b, dashed line).

The maximal electrically-evoked overflow verified was 0.69% of tissue's total amine content (64.29% increase;  $P < 0.0001$ ), occurring with a rauwolscline concentration of 100 nM after S4. The overflow values were 0.31% after rauwolscline 10 nM and S2 (14.52% increase;  $P = 0.0166$ ) and 0.55% after rauwolscline 30 nM and S3 (12.24% increase;  $P = 0.0001$ ).

Determination of the fractional rate of loss per minute of 3N-NA in the samples just before S2 (minute 155), S3 (minute 185) and S4 (minute 215) revealed that rauwolscline alone seems not to affect the spontaneous outflow of tritium, like in the rabbit cornea (Fig. 1b, solid line). In the human cornea its mean value remains at about  $9.00 \times 10^{-3}$  pmol/g per minute without electrical stimulation.

When considering the fractional rate of loss per shock, it was found to increase also in a concentration-dependent manner (Fig. 2b). In this regard, after S2 and with a rauwolscline concentration of 10 nM, the fractional rate of loss increased to  $3.28 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock (8.93% increase;  $P = 0.9999$ ); after S3 and with rauwolscline 30 nM, it increased to  $7.91 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock (162.70% increase;  $P = 0.5016$ ) and after S4 and with rauwolscline 100 nM, it increased to  $1.08 \times 10^{-4}$  pmol/g per shock (259.92% increase;  $P = 0.1538$ ). As stated before, the value expressed for S1 denotes the mean value ( $3.01 \times 10^{-5}$  pmol/g per shock) found in the experiments of electrical stimulation without addition of rauwolscline.

**Study of morphology by immunofluorescence staining and confocal microscopy – Human & Rabbit.** It should be noted that some of the primary antibodies (anti-CGRP, anti-alpha-2) available had been produced from a rabbit host thus making them unreliable for accurately staining rabbit tissue. We were therefore able to perform a more thorough study in human corneas. Nevertheless, overall results in the rabbit are worth mentioning.

In human corneas ( $n = 2$ ; Figs. 3–7), as in rabbit's ( $n = 4$ ; images not shown), staining for **protein gene product 9.5 (PGP)** was evident in linear branching patterns in the anterior stroma (Fig. 3a), with segments of considerable length (Fig. 3b). Similar linear patterns can also be seen in the basal layer of the epithelium with some extensions to the apical cells (Fig. 3c). These epithelial extensions were not evident in rabbit corneas. No PGP staining was evident in the endothelium of either species.

In both human and rabbit corneas, staining for **dopamine-beta-hydroxylase (DBH)** was found in the cytoplasm of epithelial cells either in peripheral (Fig. 3a) as in central (Fig. 3c) cornea. A linear staining pattern for DBH was more evident in the sub-epithelial anterior stroma (Fig. 3a, c), while a more clumped pattern emerged from deeper anterior stroma (Fig. 3b). Some co-localization with PGP staining is apparent particularly in the peripheral cornea. No staining at all occurred in the endothelium.

Staining for **tyrosine hydroxylase (TH)** was found scarcely in the anterior stroma and mainly in the peripheral human cornea. Staining was brighter in the rabbit cornea. Occasional co-localization with DBH was found (Fig. 4). No staining occurred in the epithelium nor endothelium.

Staining for **vimentin** was bright in Descemet's membrane and evident in the posterior (Fig. 5a) and anterior (Fig. 5b) stroma with a well-arranged linear and sometimes clumped pattern, with minute co-localization with DBH. Staining was more diffuse in the rabbit cornea. No staining was found in the epithelium nor endothelium.

Staining for **calcitonin gene-related peptide (CGRP)** was found mostly in intercellular spaces of the human corneal epithelium. In the anterior stroma it co-localizes with PGP but not with DBH staining (Fig. 6). No staining was found in the posterior stroma nor in the endothelium.

Finally, staining for **alpha-2 adrenoceptors** was evident in intercellular spaces of the human corneal epithelium and more pronounced in the basal layer, with minute co-localization with PGP, along with linear staining in the anterior stroma, more intense peripherally

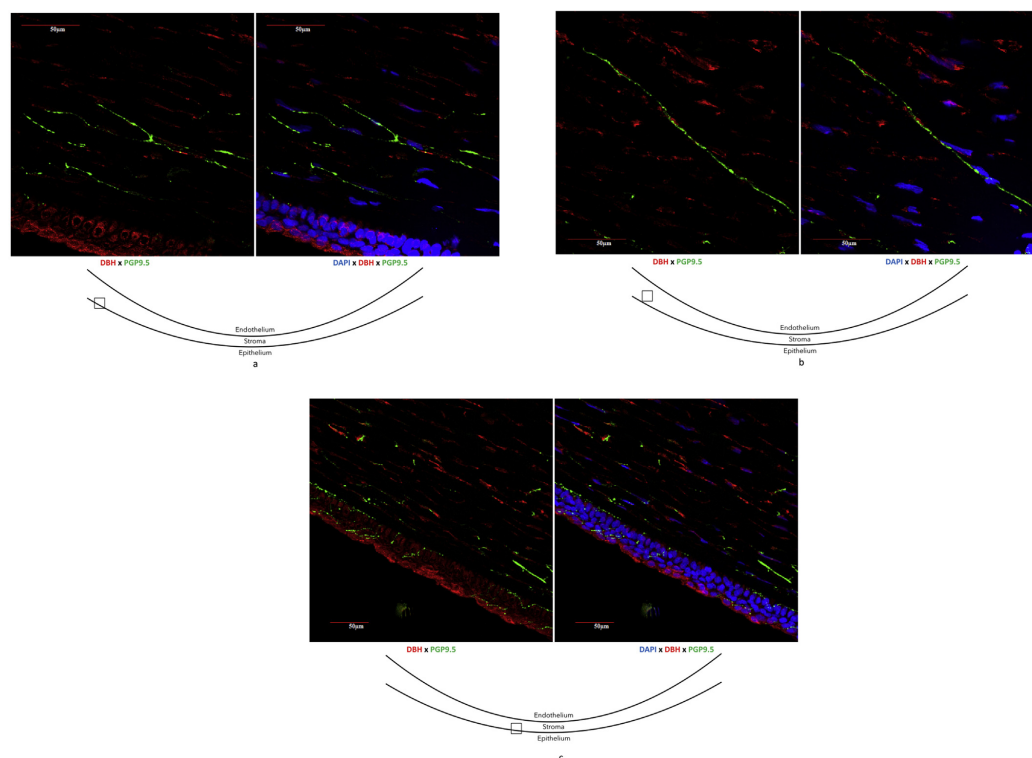


Fig. 3. Immunofluorescence staining of the human cornea with anti-DBH (dopamine-beta-hydroxylase) and anti-PGP (protein gene product 9.5) monoclonal antibodies (nuclei stained with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole); peripheral epithelium and anterior stroma (3a), peripheral anterior stroma (3b), central epithelium and anterior stroma (3c).

(Fig. 7), and also co-localizing with PGP. No staining was found in the posterior stroma nor the endothelium.

**Assay of catecholamine content in corneal lamellar sections – Human & Rabbit.** In human corneal lamellar sections ( $n = 4$ ), only NA was identified (AD/NA ratio 0.00). Concentration of NA was  $9.78 \pm 3.75$  pmol/g in the epithelium,  $2.95 \pm 1.02$  pmol/g in the stroma and  $15.22 \pm 4.99$  pmol/g in the endothelium (Fig. 8b). Only the difference between NA concentrations in stroma versus endothelium was found to be statistically significant ( $P = 0.0347$ ); other differences were not (epithelium vs. stroma  $P = 0.4497$ ; epithelium vs. endothelium  $P = 0.6746$ ).

In rabbit's corneal epithelium ( $n = 6$ ), NA was identified at a concentration of  $238.96 \pm 54.59$  pmol/g and AD at a concentration of  $19.74 \pm 5.92$  pmol/g (AD/NA ratio 0.08;  $P = 0.0028$ ); in the stroma, concentration of NA was  $48.17 \pm 7.80$  pmol/g and that of AD was  $4.13 \pm 1.01$  pmol/g (AD/NA ratio 0.08;  $P = 0.9569$ ); in the endothelium, concentration of NA was  $525.36 \pm 71.57$  pmol/g and no AD was found (AD/NA ratio 0.00) (Fig. 8a). The difference between NA concentrations in the different lamellar sections were found to be statistically significant (epithelium vs. stroma  $P = 0.0116$ ; epithelium vs. endothelium  $P < 0.0001$ ; stroma vs. endothelium  $P < 0.0001$ ), but the differences between AD concentrations were not.

#### 4. Discussion

Our findings have shed additional light into the physiology of NA

release, its intrinsic regulation and overall distribution of sympathetic terminals in the cornea. Many clinical and pathological implications may therefore be derived.

First, some considerations are deserved regarding the spontaneous outflow of NA and the influence of electrical stimulation and alpha-2 adrenoceptor antagonism – in other words, the prejunctional regulation of NA release. Although the spontaneous outflow (or basal efflux) of 3H-NA was shown to decrease over time in the cornea because of progressive shortening of available amine, it became evident that the amount of amine released per unit of time (the fractional rate of loss per minute) was not subject to variation in basal conditions (i.e. without stimulation) in both rabbit and human corneas.

In both species, similar stimulation conditions were shown to increase the fractional rate of loss per minute by similar amounts. It increased significantly by about 15% in rabbit corneas and 9% in human corneas. The amount of 3H-NA released specifically by electrical stimulation as a proportion of tissue tritium was found to be roughly the same throughout S1 to S4. This electrically-evoked overflow of 3H-NA reflects action potential-induced neuronal release of NA (Starke, 1977).

Interestingly, some variation in stimulation-induced NA release was found particularly in human corneas, maybe related to the interplay of negative and positive feedback mechanisms on NA exocytosis exerted by autoreceptors like alpha-2 and beta-2 adrenoceptors (Trendelenburg et al., 2003). In support of such hypothesis is the fact that the amount of 3H-NA released by each individual electric shock (i.e. the fractional rate of loss per shock) (Guimarães et al., 2004) is the same. This was also



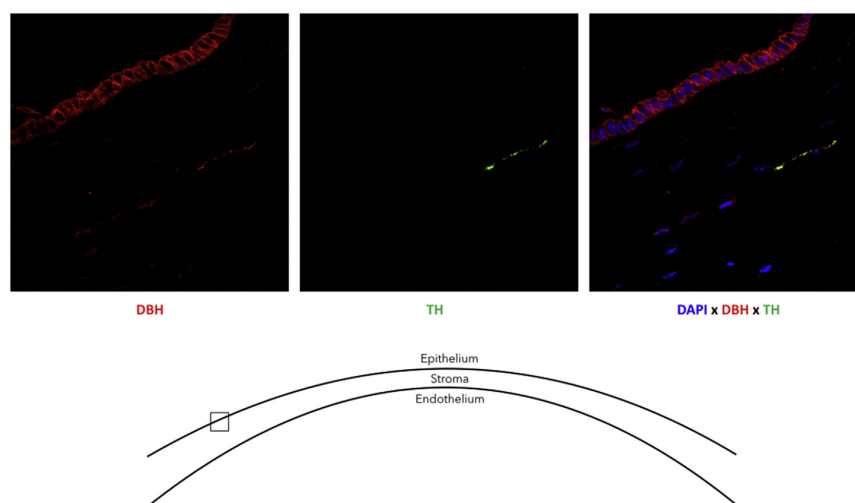


Fig. 4. Immunofluorescence staining of the peripheral human cornea with anti-DBH (dopamine-beta-hydroxylase) and anti-TH (tyrosine hydroxylase) monoclonal antibodies (nuclei stained with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole); it should be noted that it is mostly the basal layer of the epithelium that is displayed, with some remnants of additional layers (probably shed because of the histological preparation).

found to be of the same order of magnitude in both human and rabbit corneas ( $10^{-5}$  pmol/g per shock) thus suggesting similar biologic activity of adrenergic mechanisms.

Previous work has shown that tetrodotoxin  $0.3 \mu\text{M}$  (voltage-gated sodium channel blocker) when added 15 min before an event of electrical stimulation, abolishes the overflow response (A. U. Trendelenburg et al., 1997). Not having performed such experiment is an obvious limitation to our work, in that it would make a stronger case for action potential-induced neurotransmitter release.

Second, in order to study the influence of neuronal presynaptic autoreceptors, an  $\alpha$ -2 adrenoceptor antagonist was added. We found that the fractional rate of loss of tritium per minute before electrical stimulation was not affected by the presence of increasing concentrations of rauwolscine alone – that is, the spontaneous outflow of amines is not disturbed by blockage of  $\alpha$ -2 adrenoceptors (Fig. 1a and b, solid line), possibly because of the small amount released being insufficient for adequate presynaptic modulation (bear in mind that neuronal and extraneuronal uptake were blocked by cocaine and hydrocortisone) (Luchelli-Fortis and L.S., 1975; Starke, 1977). In other words, the antagonist by itself had no effect on basal 3H-NA outflow in either rabbit and human corneas.

With electrical stimulation, rauwolscine further increased the electrically-evoked overflow of 3H-NA in a concentration-dependent manner (Fig. 1a and b, dashed line), up to about 75% in rabbits and 64% in humans at  $100 \text{ nM}$ , highly statistically significant ( $P < 0.0001$ ). Our choice of relatively long pulse trains (40 s) allowed for  $\alpha$ -2 adrenoceptor-mediated autoinhibition of 3H-NA release (Starke, 1977), which became apparent on reversal of this effect by  $\alpha$ -2 adrenoceptor antagonist.

This effect of rauwolscine goes all the way down to the amount of tritium released per shock (the fractional rate of loss per shock), which also increased in a concentration-dependent manner (Fig. 2a and b) up to about 542% in rabbits and 260% in humans at  $100 \text{ nM}$ , although only statistically significant in rabbits (perhaps because of a smaller sample of human corneas). It should also be added that some attenuation of the release-enhancing effect may be due to hypothetical additional effects of the adrenoceptor antagonist (i.e. blockage of

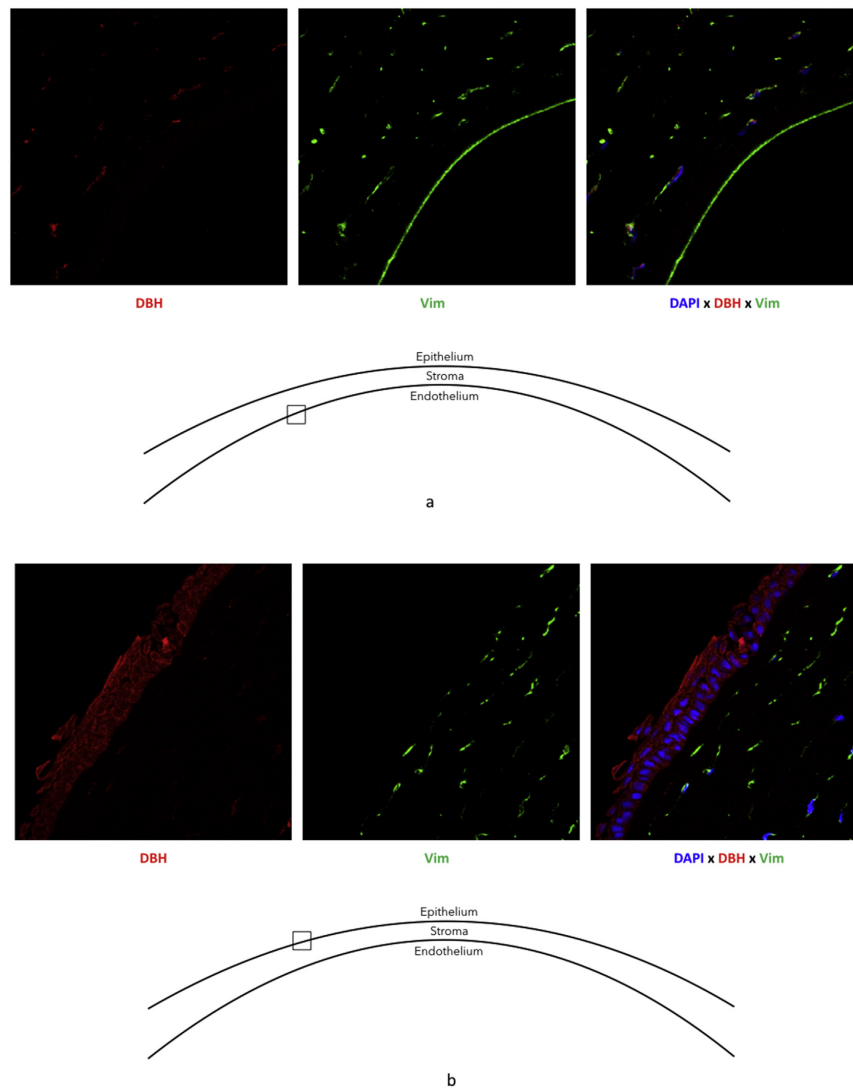
calcium channels at axon terminals) or the interplay of other presynaptic receptors (A. U. Trendelenburg et al., 1997).

To our knowledge, this is the first functional demonstration of the neuronal release of NA by electrical stimulation in the cornea and its regulation by the interplay of presynaptic  $\alpha$ -2 autoreceptors.

Third, the demonstration of prejunctional regulation of neuronal NA release may clarify the link between adrenergic mechanisms and corneal homeostasis and disease. The human corneoscleral limbus is home to a heterogeneous population of nerve terminals in close contact with stem cell niches, suggesting potential neuronal contributions to the limbal environment (Al-Aqaba et al., 2017). For instance, sensory nerves were shown to have an inhibitory effect over corneal neovascularisation, and conversely new vessels inhibit nerve growth (Ferrari et al., 2013). Specifically for sympathetic innervation, it has been implicated in modulating ion transport and the sensitivity of corneal sensory fibres (Klyce et al., 1985; Kubilus and Linsenmayer, 2010). In this regard, a model of trigeminal-derived neuropathic pain had suggested that activation of  $\alpha$ -2 adrenoceptors may inhibit nociceptive transmission (Shaheen et al., 2014; Takeda et al., 2002). We believe this may contribute to the well-known epithelial toxicity and increase in central corneal thickness originated by  $\alpha$ -2 adrenoceptor agonists such as apraclonidine or brimonidine (Grueb et al., 2011; Shah et al., 2015) as these drugs inhibit neuronal NA release in the cornea.

We therefore propose that binding to autoreceptors is the main intrinsic mechanism by which neuronal-derived NA regulates its own release and that of other neurotransmitters, and possibly limbus-derived peptides, involved in corneal homeostasis. Neuronal-derived factors are probably of unsurmountable importance in avascular tissues like the cornea.

Several studies in humans and other mammals have shown that sympathetic nerves release neuropeptides other than NA that may be involved in corneal neurogenic inflammation and remodelling following injury (Cruzat et al., 2017; Gonzalez-Coto et al., 2014; Uusitalo et al., 1989). In the example of mice, sympathetic nerves were deemed pivotal in the pathophysiology of herpetic keratitis. In one study, chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine increased



**Fig. 5.** Immunofluorescence staining of the human cornea with anti-DBH (dopamine-beta-hydroxylase) and anti-vimentin monoclonal antibodies (nuclei stained with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole); posterior stroma and Descemet's membrane (**5a**), epithelium and anterior stroma (**5b**).

susceptibility to Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) keratitis. The authors observed no differences in infiltrating HSV-1-specific cytotoxic T lymphocytes in the cornea, but found increased substance P and decreased IFN- $\gamma$  levels in the trigeminal ganglion (Templeton et al., 2008). In other work, sensory nerves were found to retract from the herpes-infected cornea and replaced by TH-positive sympathetic nerves hyperinnervating the corneal stroma. Superior cervical ganglionectomy was shown to prevent sympathetic invasion along with meta-herpetic corneal opacity and neovascularisation. It also facilitated sensory re-innervation and recovery of corneal sensitivity (Yun et al., 2016).

We believe the aforementioned examples further illustrate the role

of sympathetic nerves in inflammatory and tissue repair responses in the cornea, as part of an overall model of neurogenic inflammation and homeostasis.

Additional considerations are due regarding relations between catecholamine content in corneal lamellar sections and morphological and functional data. In both species, NA predominates significantly in the cornea (we didn't actually find AD in human corneal lamellar sections and in rabbits the levels of NA were roughly ten times those of AD), with the highest NA concentration in the endothelium, closely followed by the epithelium, and minute levels in the stroma (Fig. 8a and b). In rabbits, AD was found almost exclusively in the epithelium, and

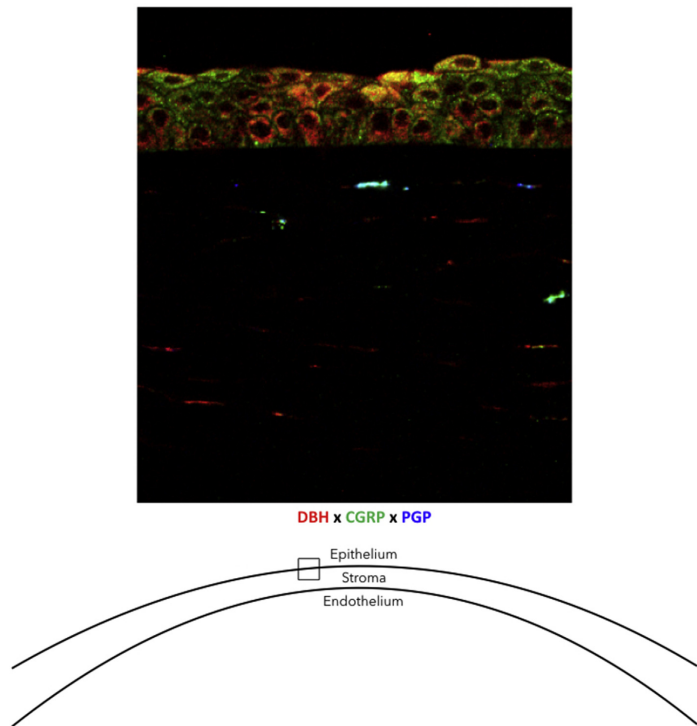


Fig. 6. Immunofluorescence staining of the central human cornea with anti-DBH (dopamine-beta-hydroxylase), anti-CGRP (calcitonin gene related peptide) and anti-PGP (protein gene product 9.5) monoclonal antibodies (nuclei stained with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole).

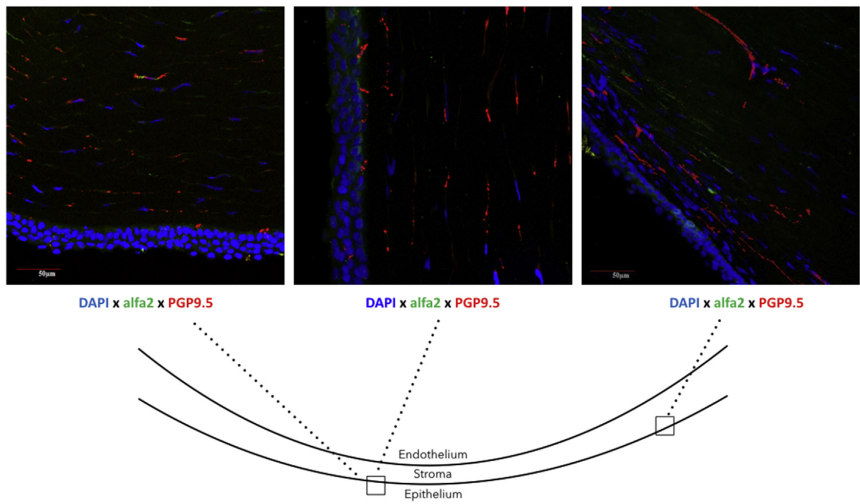


Fig. 7. Immunofluorescence staining of the human cornea with anti- $\alpha$ -2a adrenoceptors and anti-PGP (protein gene product 9.5) monoclonal antibodies (nuclei stained with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole); left and middle images relate to central epithelium and anterior stroma; right image relates to peripheral epithelium and anterior stroma.

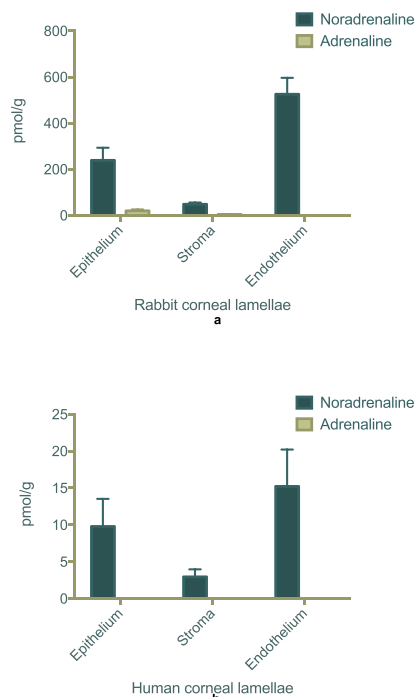


Fig. 8. Catecholamine concentration in the three corneal lamellae (epithelium, stroma, endothelium) of rabbit (8a) and human (8b) eyes.

this is in accordance with previous reports (Pullar et al., 2007; Yasukura et al., 1995).

Active synthesis is suggested when the ratio between an enzymatic end product and its substrate is higher than 1, that is, the chemical equilibrium is shifted towards the end product; the reverse is true for ratios lower than 1, which suggest a stall in production. Therefore, AD being produced from NA, we calculated AD/NA ratios. Those were obviously null in human corneas as no AD was detected, and in rabbit corneas AD/NA ratios were much lower than 1 in every corneal lamella (0.08 maximum), from which we may draw one of two conclusions: either 1) synthesis of AD is not a physiologically active process, with the minute levels of AD found in the epithelium reflecting vestigial extra-adrenal expression of phenylethanolamine-N-methyltransferase (Bohn et al., 1986; Krizanová et al., 2001); or 2) it simply doesn't occur at all (AD may actually be captured from nearby tissues or blood vessels). This is in accordance with previously described findings in which the same conclusions were drawn from concentric segments of the cornea (Figueira et al., 2018).

In humans, secretion of NA and AD in the tear film as described in previous work (Trobe and Rumley, 1984) would not explain why only one catecholamine – NA – is to be found in the corneal epithelium and thus tears are not a likely source of corneal catecholamines.

Traditionally, sympathetic innervation of the human cornea is believed to be of modest expression when compared to other animals, including the rabbit (Ehinger, 1971; Laties and Jacobowitz, 1966; Toivanen et al., 1987). Studies on this subject relied generally on histofluorometric methods for morphological identification of sympathetic nerves under the microscope, or on measurement of the content of catecholamines and other co-transmitters.

Our results show that, irrespective of differences in corneal catecholamine concentrations between rabbits and humans (about 1 log unit lower in the human cornea), the amount of NA released (spontaneously or by electrical stimulation) is of the same order of magnitude in both species ( $10^{-2}$  pmol/g).

Given that overall corneal sympathetic nerve density may be inferred from the amount of radiolabelled NA released by nerve stimulation (Potes et al., 2010), we therefore propose that sympathetic innervation is of similar functional relevance in both species, and that differences in corneal concentrations may be attributable to extraneuronal sequestration of catecholamines. We believe that this relevant autonomic contribution to corneal innervation provides new insight to the pathophysiology of neurotrophic diseases and neurogenic inflammation, as in the examples of herpetic keratitis and alpha-2 agonists' corneal toxicity cited above.

Regarding immunofluorescence, our option for PGP staining is vindicated on its role as a pan-neuronal biomarker (Marfurt et al., 1998), allowing easier differentiation between nerves and other cell types. Somatic and autonomic nerves were therefore revealed mainly in the anterior corneal stroma. CGRP staining was tried as this is a neuropeptide involved in pain sensation (Mikulec and Tanelian, 1996) and thus a potential marker of sensory nerves, although corneal nerves' immunoreactivity has been reported to be scarce (Stone et al., 1986; Uusitalo et al., 1989). In our experiments, CGRP identified sensory fibres in the intercellular spaces of the epithelium and anterior stroma (Fig. 6).

DBH catalyses the synthesis of NA from dopamine and is known to be located inside vesicles in the sympathetic nerves and some other tissues in soluble form (Lamoureux et al., 1987; Marsden, 2009; Potes et al., 2010; Weinshilboum and Axel, 1971) thus serving as a surrogate for adrenergic mechanisms, neuronal or non-neuronal. Central and peripheral epithelial cells contained DBH suggesting that these may have NA-synthesising capability. In similar fashion, the presence of DBH in deeper anterior stroma may suggest NA-producing keratocytes. Sympathetic fibres containing DBH and PGP were revealed in the subepithelial anterior stroma (Fig. 3a, b, c), particularly in peripheral human cornea and extending to the basal layer of the epithelium.

To further distinguish DBH-expressing cells, we performed TH staining. TH catalyses the formation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) from tyrosine and is deemed a marker of sympathetic fibres (Starke, 1977) and has also been localized to corneal nerves. Early fluorescence microscopy studies, while acknowledging appreciable mammalian interspecies differences, had suggested that in primates and humans adrenergic terminals are more numerous in the embryonic cornea while scarcer in the adult and mostly arranged in a perilimbal plexus (Ehinger, 1971, 1966; Laties and Jacobowitz, 1966). Immunohistochemical techniques in human eyes had described TH-immunoreactive nerves mainly in the limbus, in association with blood vessels or penetrating the corneal stroma radially to form subepithelial plexuses with occasional intraepithelial terminals (Marfurt and Ellis, 1993). In our data from both species, TH staining revealed a higher expression of sympathetic fibres (also DBH-positive) in the anterior peripheral corneal stroma (Fig. 4).

Given the fact that PGP may also be expressed by fibroblasts in human cutaneous wounds (Olerud et al., 1998), we looked for an additional marker capable of distinguishing stromal keratocytes from nerve fibres. In this regard, vimentin is an intermediate protein filament and considered a reliable marker of fibroblasts (Agocha and Eghbali-Webb, 1997) and, in the case of the cornea, of keratocytes (Scott et al., 2011), confirming their mesenchymal origin and distinguishing them from neuronal tissue (Ivaska et al., 2007). Although corneal epithelial cells, as other epithelia, have been shown to express vimentin intermediate filaments during cell maturation and wound repair (Kasper et al., 1992; SundarRaj et al., 1992), immunoreactivity was not found in epithelial cells during our experiments. In both species, staining of Descemet's membrane was intense, and vimentin was

found in keratocytes throughout the stroma, particularly in humans, and spared endothelial cells. Scarce co-localization with DBH suggests that keratocytes, although expressing this enzyme, probably don't play a major role in adrenergic mechanisms (Fig. 5a and b). Nevertheless, a cross-talk between these cells and sympathetic nerves may be reflected by the former's ability to secrete nerve growth factor (Shaheen et al., 2014), along with the latter's modulation of cellular migration and repair. Once again, overall corneal nerve functions and respective interplay, both sensitive and autonomic, may be key in explaining the link between tissue sensitivity and integrity.

In light of our findings in the study of prejunctional effects, we strived to identify **alpha-2 adrenoceptor** whereabouts in the human cornea. Given their preferential presynaptic location as autoreceptors (Gyires et al., 2009; Starke, 1977) they may serve as additional markers of postganglionic sympathetic terminals. These were found mainly in intercellular spaces of the epithelial basal layer (also PGP-containing) and particularly in the peripheral anterior stroma (Fig. 7). A limitation to our findings may be posed by the fact that our chosen primary antibody was directed against the alpha-2a adrenoceptor subtype, and other studies have suggested that alpha-2b and 2c subtypes may also constitute relevant presynaptic adrenoceptor populations, although not specifically mentioning corneal tissue (Civantos Calzada and Aleixandre De Artiñano, 2001; Gyires et al., 2009).

Finally, the high concentrations of NA found in the endothelium suggest that this amine is probably captured by endothelial cells from the aqueous humour where it is released by sympathetic nerves in the iris, a mechanism proposed in both rabbits and humans (Figueira et al., 2018). Also, no AD levels were described in the aqueous, and accordingly we found no AD in the endothelium. The fact that the endothelium lacks the enzymes TH and DBH provides additional evidence that its NA content is derived from the aqueous humour. Absence of CGRP, PGP and **alpha-2 adrenoceptor** staining further suggests that no nerves, sensory or autonomic, seem to be present in the posterior stroma and endothelium. In the epithelium, the majority of NA is probably derived from sympathetic terminals in the basal layer of the epithelium and subepithelial anterior stroma, with a minor contribution from epithelial cells (which probably sequester neuronal-released NA, albeit some synthesis may occur). As mentioned, no histological control of the samples was made in order to confirm that only epithelial cells, stromal tissue or endothelial cells and Descemet's membrane were present in each section, as we relied only on the reproducibility of the surgical technique (e.g., methylene blue staining and surgical stripping of Descemet's). This may impart somewhat on catecholamine determination, but we believe it had little interference as the differences in concentrations found were extremely wide between lamellar sections.

Some other limitations must be highlighted in our work. As mentioned by others (Batawi et al., 2017; He et al., 2010), older age, diabetes mellitus and higher levels of HbA1c may significantly affect corneal sub-basal nerve plexus morphology and density, although less is known regarding the particular case of sympathetic fibres. Also, eventual post-mortem changes in nerve topography and function were unaccounted for as death-to-preservation time for human donor corneas was probably heterogeneous and also unavailable to us.

Additional studies are needed to clarify the role of sympathetic innervation and overall adrenergic mechanisms in healthy and diseased human corneas. The specific role of sympathetic nerves in neurogenic inflammation and neurotrophic keratopathy has yet to be fully elucidated in humans. Furthermore, such undertaking would allow for easier replacement, refinement or reduction of the use of animals in research (McGrath and Lilley, 2015).

## 5. Conclusions

The occurrence of an electrically-evoked overflow of NA reflects action potential-induced neurotransmitter release by sympathetic nerves. The addition of an alpha-2 adrenoceptor antagonist, while

producing no effect on basal NA outflow, increased the electrically-evoked overflow of NA in a concentration-dependent manner. These findings strongly support an alpha-2 adrenoceptor-mediated mechanism for neuronal NA release in the cornea.

NA predominates significantly over AD in the cornea of both species (only NA is detected in the human cornea), particularly in the endothelium (sequestered from aqueous humour) and epithelium (mostly neuronal-derived, with some uptake by epithelial cells). Synthesis of AD in the rabbit corneal epithelium seems not to be physiologically relevant and this amine is probably seized from the blood or adjacent tissues. Irrespective of differences in catecholamine concentrations, sympathetic innervation has similar functional relevance in rabbit and human corneas as nerve density may be inferred from the amount of radiolabelled NA released by stimulation, and this was found to be of the same order of magnitude in both species.

Immunofluorescence revealed that sympathetic fibres (DBH and TH positive) are located in the anterior stroma, mostly in the peripheral human cornea, and extend to the basal layer of the epithelium. Epithelial cells contain NA and express the enzyme DBH (but not TH), which may reflect hypothetical NA-synthesising capability. Selected stromal keratocytes appear to express the enzyme DBH but only vestigial levels of NA were detected in the corneal stroma, suggesting that those cells probably don't play a major role in adrenergic mechanisms.

We have thus established a regulatory pathway for the neuronal release of NA in the cornea and defined its functional relevance, while providing additional clarification on the topography of sympathetic nerves.

## Acknowledgements

Patrício Soares-da-Silva, MD, PhD  
 Maria-Augusta Vieira-Coelho, MD, PhD  
 Amândio Rocha-Sousa, MD, PhD  
 Joana Afonso, ENG  
 Fernando Magro, MD, PhD  
 Manuel Falcão, MD, PhD  
 Armando Lemos, PhD  
 Margarida Duarte-Araújo, PhD  
 Sociedade Portuguesa de Oftalmologia | Portuguese Society of Ophthalmology

## References

- Agocha, A.E., Eghbali-Webb, M., 1997. A simple method for preparation of cultured cardiac fibroblasts from adult human ventricular tissue. *Mol. Cell. Biochem.* 172, 195–198. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006848512174>.
- Al-Aqaba, M.A., Anis, F.S., Mohammed, I., Dua, H.S., 2017. Nerve terminals at the human corneal scleral limbus. *Br. J. Ophthalmol.* <http://dx.doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-311146>.
- Batawi, H., Shalabi, N., Joag, M., Koru-Sengul, T., Rodriguez, J., Green, P.T., Campigotto, M., Karp, C.L., Galor, A., 2017. Sub-basal corneal nerve plexus analysis using a new software technology. *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 0, 1. <http://dx.doi.org/10.1097/ICL.0000000000000375>.
- Bohn, M.C., Goldstein, M., Black, I.B., 1986. Expression and development of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) in rat brain stem: studies with glucocorticoids. *Dev. Biol.* 114, 180–193. [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90394-5](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(86)90394-5).
- Civantos Calzada, B., Aleixandre De Artiñano, A., 2001. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.* <http://dx.doi.org/10.1006/phrs.2001.0857>.
- Cruzat, A., Qazi, Y., Hamrah, P., 2017. In vivo confocal microscopy of corneal nerves in health and disease. *Ocul. Surf.* 15, 15–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2016.09.004>.
- Davis, G.C., Kissinger, P.T., Shoup, R.E., 1981. Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* 53, 156–159. <http://dx.doi.org/10.1021/ac00225a006>.
- Ehinger, B., 1971. A comparative study of the adrenergic nerves to the anterior eye segment of some primates. *Zeitschrift für Zellforsch. und mikroskopische Anat.* 116, 157–177. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00331259>.
- Ehinger, B., 1966. Connections between adrenergic nerves and other tissue components in the eye. *Acta Physiol. Scand.* 67, 57–64. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.1966.tb03287.x>.
- Ferrari, G., Hajrasouliha, A.R., Sadrai, Z., Ueno, H., Chauhan, S.K., Dana, R., 2013. Nerves

- and neovessels inhibit each other in the cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 813–820. <http://dx.doi.org/10.1167/iov.11-8379>.
- Figueira, L., Ferreira, C., Janeiro, C., Serrao, P., Falcão-Reis, F., Moura, D., 2018. Concentration gradient of noradrenaline from the periphery to the centre of the cornea - a clue to its origin. *Exp. Eye Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2018.01.008>.
- Figueira, L., Matos, J., Serrao, P., Falcão-Reis, F., Moura, D., 2012. Concentration gradient of endogenous noradrenaline from periphery to centre in the rabbit cornea. *Acta Ophthalmol.* 90, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2012.2233.x/full>.
- Furchgott, R., 1972. The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko, H., M.E (Eds.), *Catecholamines. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, pp. 228–335.
- Ghoghawala, S.Y., Mannis, M.J., Pullar, C.E., Rosenblatt, M.I., Isseroff, R., 2008.  $\beta_2$ -Adrenergic receptor signaling mediates corneal epithelial wound repair. 49, 1857–1863. <http://dx.doi.org/10.1167/iov.07-0925>.
- Gonzalez-Coto, A.F., Alonso-Ron, C., Alcalde, I., Gallar, J., Meana, Á., Merayo-Lloves, J., Belmonte, C., 2014. Expression of cholecystokinin, gastrin, and their receptors in the mouse cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 1965–1975. <http://dx.doi.org/10.1167/iov.13-12068>.
- Graefe, K.H., Stefano, F.J.E., Langer, S.N.Z., 1973. Preferential metabolism of (–) 3 H-norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens. *Biochem. Pharmacol.* 22.
- Grueb, M., Bartz-Schmidt, K.U., Rohrbach, J.M., 2008. Adrenergic regulation of cAMP/protein kinase A pathway in corneal epithelium and endothelium. *Ophthalmic Res.* 40, 322–328. <http://dx.doi.org/10.1159/000150446>.
- Grueb, M., Mielke, J., Rohrbach, J.M., Schlote, T., 2011. Effect of brimonidine on corneal thickness. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 27, 503–509. <http://dx.doi.org/10.1089/jop.2010.0198>.
- Guimarães, S., Carneiro, C., Brandão, F., Pinheiro, H., Albino-Teixeira, A., Moura, D., 2004. A pharmacological differentiation between postjunctional (AT1A) and prejunctional (AT1B) angiotensin II receptors in the rabbit aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370, 262–269. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-004-0977-7>.
- Guimaraes, S., Osswald, W., 1969. Adrenergic receptors in the veins of the dog. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 133–140.
- Gyires, K., Zádori, Z.S., Török, T., Mátyus, P., 2009.  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem. Int.* 55, 447–453. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2009.05.014>.
- He, J., Bazan, N.G., Bazan, H.E.P., 2010. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 91, 513–523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2010.07.007>.
- Ivaska, J., Pallari, H.M., Nevo, J., Eriksson, J.E., 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.040>.
- Jones, M.A., Marfurt, C.F., 1996. Sympathetic stimulation of corneal epithelial proliferation in wounded and nonwounded rat eyes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2535–2547.
- Kasper, M., Stosiek, P., Lane, B., 1992. Cytokeratin and vimentin heterogeneity in human cornea. *Acta Histochem.* 93, 371–381. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80106-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80106-6).
- Klyce, S.D., Beuerman, R.W., Crosson, C.E., 1985. Alteration of corneal epithelial ion transport by sympathetomy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 434–442.
- Krizanová, O., Micutková, L., Jeloková, J., Filipenko, M., Sabban, E., Kvetnanský, R., 2001. Existence of cardiac PNMT mRNA in adult rats: elevation by stress in a glucocorticoid-dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1372–H1379.
- Kubilus, J.K., Linsenmayer, T.F., 2010. Developmental corneal innervation: interactions between nerves and specialized apical corneal epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 782–789. <http://dx.doi.org/10.1167/iov.09-3942>.
- Lamoureux, A., Vigny, A., Faucon Biguet, N., Darmon, M.C., Franck, R., Henry, J.P., Mallet, J., 1987. The primary structure of human dopamine-beta-hydroxylase: insights into the relationship between the soluble and the membrane-bound forms of the enzyme. *EMBO J.* 6, 3931–3937.
- Laties, A.M., Jacobowitz, D., 1966. A comparative study of the autonomic innervation of the eye in monkey, cat, and rabbit. *Anat. Rec.* 383–395.
- Luchelli-Fortis, M.A., L.S., 1975. Selective inhibition by hydrocortisone of 3H-norepinephrine formation during 3H-transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275.
- Marfurt, C.F., Ellis, L.C., 1993. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *J. Comp. Neurol.* 336, 517–531. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903360405>.
- Marfurt, C.F., Jones, M.A., Thrasher, K., 1998. Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Exp. Eye Res.* 66, 437–448. <http://dx.doi.org/10.1006/exer.1997.0445>.
- Marsden, C.A., 2009. Dopamine: the rewarding years. *Br. J. Pharmacol.* 147, S136–S144. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706473>.
- McGrath, J.C., Lilley, E., 2015. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3189–3193. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12955>.
- Mikulec, A.A., Tanelian, D.L., 1996. CGRP increases the rate of corneal re-epithelialization in an *in vitro* whole mount preparation. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 12, 417–423.
- Moreira-Rodrigues, M., Graca, A.L., Ferreira, M., Afonso, J., Serrao, P., Morato, M., Ferreira, F., Correia-de-Sa, P., Ebert, S.N., Moura, D., 2014. Attenuated aortic vasodilation and sympathetic prejunctional facilitation in epinephrine-deficient mice: selective impairment of beta2-adrenoceptor responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 351, 243–249. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.114.217281>.
- Moura, D., Azevedo, L., Guimarães, S., 1990. Differential distribution in, and release from, sympathetic nerve endings of endogenous noradrenaline and recently incorporated catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342, 153–159. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00166958>.
- Moura, E., Afonso, J., Hein, L., Vieira-Coelho, M.A., 2006. Alpha2-adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *Br. J. Pharmacol.* 149, 1049–1058. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706950>.
- Müller, L.J., Marfurt, C.F., Kruse, F., Tervo, T.M.T., 2003. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76, 521–542. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00050-2).
- Olerud, J.E., Chiu, D.S., Usui, M.L., Gibran, N.S., Ansel, J.C., 1998. Protein gene product 9.5 is expressed by fibroblasts in human cutaneous wounds. *J. Invest. Dermatol.* 111, 565–572. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00330.x>.
- Potes, C.S., Turek, V.F., Cole, R.L., Vu, C., Roland, B.L., Roth, J.D., Riediger, T., Lutz, T. a., 2010. Noradrenergic neurons of the area postrema mediate amylin's hypophagic action. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R623–R631. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00791.2009>.
- Price, M.O., Price, F.W., 2010. Endothelial keratoplasty - a review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-9071.2010.02213.x>.
- Pullar, C.E., Zhao, M., Song, B., Pu, J., Reid, B., Ghoghawala, S., McCaig, C., Isseroff, R.R., 2007. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate corneal wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J. Cell. Physiol.* 211, 261–272. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20934>.
- Scott, S.G., Jun, A.S., Chakravarti, S., 2011. Sphere formation from corneal keratocytes and phenotype specific markers. *Exp. Eye Res.* 93, 898–905. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2011.10.004>.
- Shah, A.A., Modi, Y., Thomas, B., Wellik, S.R., Galor, A., 2015. Brimonidine allergy presenting as vernal-like keratoconjunctivitis. *J. Glaucoma* 24, 89–91. <http://dx.doi.org/10.1097/IJG.0b013e3182953aef>.
- Shaheen, B.S., Bakir, M., Jain, S., 2014. Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59, 263–285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.survophthal.2013.09.002>.
- Soares-da-Silva, P., Fernandes, M.H., Pestana, M., Vieira-Coelho, M. a., Fernandes, M.H., Albino-Teixeira, A., 1995. Assessment of renal dopaminergic system activity in the nitric oxide-deprived hypertensive rat model. *Br. J. Pharmacol.* 114, 1403–1413.
- Starke, K., 1977. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77, 1–124.
- Stone, R.A., Kuwayama, Y., Terenghi, G., Polak, J.M., 1986. Calcitonin gene-related peptide: occurrence in corneal sensory nerves. *Exp. Eye Res.* [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835\(86\)80097-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4835(86)80097-5).
- SundarRaj, N., Rizzo, J.D., Anderson, S.C., Gesiotto, J.P., 1992. Expression of vimentin by rabbit corneal epithelial cells during wound repair. *Cell Tissue Res.* 267, 347–356.
- Takeda, M., Ikeda, M., Tanimoto, T., Lipski, J., Matsumoto, S., 2002. Changes of the excitability of rat trigeminal root ganglion neurons evoked by  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Neuroscience* 115, 731–741. [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00481-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00481-5).
- Templeton, A., Nguyen, G., Ash, J.D., Straub, R.H., Carr, D.J.J., 2008. Chemical sympathectomy increases susceptibility to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J. Neuroimmunol.* 197, 37–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jumov.2008.02.015>.
- Tervo, T., Palkama, A., 1978. Innervation of the rabbit cornea. A histochemical and electron-microscopic study. *Acta Anat. (Basel)* 102, 164–175.
- Toivanen, M., Tervo, T., Parranen, M., Vannas, A., Hervonen, A., 1987. Histochemical demonstration of adrenergic nerves in the stroma of human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 398–400.
- Trendelenburg, A.U., Philipp, M., Meyer, A., Klebroff, W., Hein, L., Starke, K., 2003. All three  $\alpha_2$ -adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368, 504–512. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-003-0829-x>.
- Trendelenburg, A.U., Sutej, I., Starke, K., 1997a. Presynaptic  $\alpha_2A/D$ -autoreceptors in the brain cortex of Cercopithecus aethiops. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355, 341–346.
- Trendelenburg, A.U., Sutej, I., Wahl, C. a., Molderings, G.J., Rump, L.C., Starke, K., 1997b. A re-investigation of questionable subclassifications of presynaptic  $\alpha_2A$ -autoreceptors: rat vena cava, rat atria, human kidney and Guinea-pig urethra. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356, 721–737.
- Trendelenburg, U., 1966. Mechanisms of supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol. Rev.* 18, 629–640.
- Trope, G.E., Rumley, A.G., 1984. Catecholamine concentrations in tears. *Exp. Eye Res.* 39, 247–250. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4835\(84\)90012-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4835(84)90012-5).
- Uusitalo, H., Krotila, K., Palkama, A., 1989. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive sensory nerves in the human and Guinea pig uvea and cornea. *Exp. Eye Res.* 48, 467–475. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4835\(89\)90030-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4835(89)90030-4).
- Walkenbach, R.J., Ye, G.S., Reinach, P.S., Boney, F., 1991. Alpha1-Adrenoceptors in human corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 3067–3072.
- Weinshilboum, R., Axel, J., 1971. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ. Res.* 28, 307–315. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.28.3.307>.
- Yasukura, T., Inoue, M., Irie, T., Hara, M., Mikami, Y., Zeng, X.T., Mikami, T., Omori, K., Minato, A., Uyama, M., 1995. Adrenergic receptor-mediated Cl<sup>-</sup> transport in rabbit corneal endothelial cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 67, 315–320.
- Yun, H., Lathrop, K.L., Hendricks, R.L., 2016. A central role for sympathetic nerves in herpes stromal keratitis in mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 1749–1756. <http://dx.doi.org/10.1167/iov.16-19183>.
- Zamir, E., Chowers, I., Banin, E., Frucht-Pery, J., 1999. Neurotrophic corneal endothelial failure complicating acute Horner syndrome. *Ophthalmology* 106, 1692–1696. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90362-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90362-7).



## V. DISCUSSÃO GERAL

Caracterização clínica dos principais factores de risco locais e sistémicos para infecção da córnea, com destaque para aqueles associados a perturbação da inervação corneana

Na população de doentes com queratite infecciosa avaliados entre 2007 e 2015 no serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar de S. João (235 casos), os agentes patogénicos mais frequentemente identificados (para uma taxa de positividade cultural de 38.4%) foram as bactérias *Staphylococcus aureus* (23.1%), *Corynebacterium macginleyi* (20.0%) e *Pseudomonas aeruginosa* (13.8%) (Ferreira C., Figueira L. et al., 2016).

A queratite infecciosa é rara na ausência de factores predisponentes. De facto, identificámos pelo menos um factor de risco local em 95.7% dos pacientes. Identificámos também factores de risco sistémicos em 27.6% e factores múltiplos em 22.0%.

Conforme sugerido em outros trabalhos (Bourcier et al., 2003; Schaefer et al., 2001), a difusão do uso de lentes de contacto tem aumentado de forma dramática a incidência de queratite. Efectivamente, na nossa amostra clínica, a par com o trauma da superfície ocular, o uso de lentes de contacto foi o principal factor predisponente (28.9% cada). No subgrupo de portadores de lentes de contacto verificámos, tal como em outros estudos (Lam et al., 2002; Ng et al., 2015), ser a *Pseudomonas* o agente mais comum. Em contraste, nos casos de trauma prevaleceram bactérias Gram positivas. Ambas as condições aumentam a probabilidade de inoculação directa de microrganismos na córnea, mas podemos assumir que o maior risco de infecção subsequente possa dever-se a dano induzido nos nervos da superfície ocular, de forma crónica no caso do uso de lentes de contacto, e de forma aguda no caso do trauma. Como fundamentos desta afirmação, a hipoxia corneana associada ao uso prolongado de lentes de contacto compromete sobretudo a função dos tecidos com elevada actividade metabólica (Bruce and Brennan, 1990; DeJaco-Ruhswurm et al., 2001), de que os melhores exemplos são as células epiteliais e os nervos da córnea, com consequente disfunção destes e perda da inter-regulação entre ambos (Shaheen et al., 2014). Sabe-se ainda que o trauma epitelial e estromal da córnea pode lesar os nervos sensitivos e autonómicos, algo clinicamente evidenciado em estudos de microscopia confocal (Cruzat et al., 2011; Patel and McGhee, 2009), sendo a regeneração nervosa e a reparação tecidular comprometidas em grau variável e dependente do mecanismo e extensão do traumatismo.

Em condições muito particulares pode ocorrer queratite infecciosa por agentes raros e improváveis, de que citaremos dois exemplos particulares. O primeiro exemplo diz respeito a um caso de queratite por *Elizabethkingia meningoseptica* (Beato J., Figueira L. et al., 2016), uma flavobactéria com ampla distribuição por diferentes áreas geográficas e habitats, mas não na microflora humana, não obstante descrições prévias de doença invasiva humana (Ceyhan et al., 2008; Hoque et al., 2001). A este propósito descrevemos recentemente um caso de úlcera de córnea por *E. meningoseptica* num paciente portador de lentes de contacto e com glaucoma primário de ângulo aberto, medicado habitualmente com latanoprost, brimonidina, timolol e brinzolamida (Beato J., Figueira L. et al., 2016). A combinação do uso crónico de fármacos hipotensores tópicos com o uso de lentes de contacto pode ter criado um ambiente favorável ao crescimento da *Elizabethkingia*, uma vez que ambas as condições são conhecidas por alterar significativamente a superfície ocular predispondo à infecção subsequente da córnea. Podemos hipoteticamente atribuir à brimonidina um mecanismo fisiopatológico adicional nesta situação, enquanto agonista alfa-2 com capacidade de interferência na inervação simpática por diminuir a libertação pré-sináptica de NA, potenciando a lesão corneana associada aos restantes factores de risco. Não se menospreza obviamente aqui o eventual papel contributivo de diversos outros mediadores pro-inflamatórios, como por exemplo as prostaglandinas.

O segundo exemplo diz respeito a um caso de queratite por *Beauveria bassiana*, um fungo encontrado naturalmente no solo e com propriedades entomopatogénicas, sendo comercializado como insecticida agrícola (Figueira et al., 2012b). O género *Beauveria* possui baixa virulência em seres humanos, sendo encontrados na literatura relatos ocasionais de doença associada a este fungo (Gürçan et al., 2006; Henke et al., 2002; Tucker et al., 2004). Todos os casos de infecção ocular reportados ocorreram em associação a trauma ocular ou a uso de lentes de contacto. A particularidade do nosso relato, não obstante a paciente ser diabética, prende-se com a identificação de um factor de risco específico: a queratopatia bolhosa (Figueira et al., 2012b). Esta condição, enquanto resultado da disfunção endotelial com edema da córnea secundário, predispõe à infecção da córnea devido à ocorrência de erosões epiteliais recorrentes pela ruptura de bolhas epiteliais (Luchs et al., 1997). Uma etiologia ocular frequente de queratopatia bolhosa é a pseudofaquia (ausência de cristalino e presença de lente intra-ocular) ou afaquia (ausência de cristalino e de lente), sendo o último o caso da nossa paciente. Devemos todavia acrescentar que a disfunção endotelial, conforme referido previamente (Zamir et al., 1999), pode ocorrer como consequência ou ser agravada



pelo compromisso da inervação simpática ocular que, no caso desta doente, poderia enquadrar-se num contexto adicional de neuropatia diabética.

A este propósito, na nossa amostra de 235 pacientes, o factor de risco sistémico mais relevante foi a diabetes mellitus (13.0%). A diabetes é uma doença que cursa com numerosas complicações microvasculares, nomeadamente a ocorrência de neuropatia somática e autonómica (Vinik et al., 2013), a qual é causa de queratopatia neurotrófica (Sacchetti and Lambiase, 2014) e aumenta previsivelmente o risco de infecção secundária da córnea. Os nossos resultados suportam esta hipótese. Diversos trabalhos documentaram também (com recurso a microscopia confocal) as alterações morfológicas no plexo nervoso sub-basal da córnea associadas ao nível de controlo glicémico (Batawi et al., 2017; He et al., 2010).

Identificámos também outros factores de risco sistémicos, nomeadamente a presença de doença mucocutânea (4.8%; acne rosácea, psoríase), de doença auto-imune sob imunossupressão farmacológica (2.4%) e de neoplasia concomitante (1.9%). As condições supracitadas, não obstante poderem ser causa de neuropatia (D. et al., 2011; Koike and Sobue, 2013; Steinhoff et al., 2013), associam-se sobretudo a alteração da competência imunológica com aumento do risco infeccioso global (Gottlieb et al., 2008).

Como em outras séries (Bourcier et al., 2003), a maioria dos casos de queratite bacteriana respondeu favoravelmente ao tratamento, evoluindo para a cura (81.8%). Não obstante, verificámos que alguns factores de risco parecem influenciar o prognóstico. Especificamente, a existência de queratopatia neurotrófica secundária a infecção herpética prévia parece atrasar e dificultar o processo de cicatrização, com maior probabilidade de formação de leucomas centrais e perda de visão. As relações específicas entre a disfunção dos nervos simpáticos e a fisiopatologia da queratite herpética e da inflamação neurogénica associada têm sido amplamente estudadas (Templeton et al., 2008; Yun et al., 2016), conforme detalharemos adiante.

Criação de um modelo experimental de córnea em animal de experiência (Coelho), com adequada reprodutibilidade no Homem, para estudo dos mecanismos adrenérgicos e da inervação simpática

A córnea de Coelho e respectiva inervação foram amplamente estudadas e são consideradas como um modelo adequado ao estudo da anatomia e fisiologia da córnea humana (Klyce et al., 1985; Tervo and Palkama, 1978; Walkenbach et al., 1991; Yasukura et al., 1995).

Na nossa investigação, verificámos que as córneas humanas e de Coelho têm uma densidade celular endotelial média semelhante, conforme medida por microscopia especular (Figueira et al., 2018a, 2012a). A paquimetria central ultrassónica média também foi similar, embora esses valores tenham uma fraca correlação com a paquimetria *in vivo*, pois a sobre-hidratação da córnea e o edema resultante decorrem geralmente da preservação no meio de armazenamento (Lindstrom et al., 1992). Como é bem conhecido a partir da queratoplastia, a espessura corneana fisiológica é normalmente restabelecida após o transplante, à medida que o edema é reabsorvido com a melhoria da função das células endoteliais (Lass et al., 2010).

Determinação da principal origem da noradrenalina (neuronal ou não-neuronal) na córnea de Coelho e na córnea humana

Tomando em consideração, nesta fase, apenas a NA e AD na córnea de Coelho, a primeira demonstrou ser a catecolamina mais abundante em todos os segmentos. A criação da técnica de trepanação dupla concêntrica produziu alguns resultados interessantes, pois permitiu detectar um gradiente de concentração para a NA, diminuindo da periferia para o centro da córnea (Figueira et al., 2012a). Contrastando com tal facto, nenhum gradiente foi encontrado para a AD (a qual apresenta maiores concentrações no segmento intermédio da córnea).

No humor aquoso de Coelho, apenas foi efectivamente detectada NA. A sua origem localizar-se-á provavelmente nos nervos simpáticos da íris, uma vez que as catecolaminas são incapazes de atravessar barreiras hemato-teciduals especializadas (Abbott et al., 2010; Weil-Malherbe et al., 1959), de que um exemplo é a barreira hemato-ocular. Corroborando tal aspecto, a AD, enquanto principal catecolamina plasmática, também não foi detectada no humor aquoso. Não se encontra descrito nenhum mecanismo molecular a nível do corpo ciliar que seja responsável pela secreção de amins no humor aquoso (Civan and Macknight, 2004;

Cole, 1977). A presença de NA no humor aquoso não produziria também um gradiente de concentração na córnea porque o movimento de convecção daquele fluido sobre o endotélio da córnea asseguraria uma distribuição homogênea desta catecolamina.

Se os vasos sanguíneos límbicos fossem uma fonte importante de catecolaminas, seriam de esperar concentrações mais elevadas de AD na córnea periférica, as quais produziriam um gradiente semelhante ao da NA, mas os nossos resultados refutaram claramente tal hipótese. Não se pode excluir que os níveis baixos de AD (menos de 10% dos de NA), detectados sobretudo no segmento intermédio da córnea de Coelho, possam dever-se a contaminação durante o processo de trepanação. Não deve também ser alheio a tal a possibilidade de um aumento na actividade física ou no *stress* sistémico, eventualmente associados ao sacrifício do animal, elevarem os doseamentos de catecolaminas por activação do sistema nervoso simpático (Fatouros et al., 2010; LeBlanc, 1976).

Em suma, a descoberta de um gradiente de concentração para a NA diminuindo da periferia para o centro da córnea de Coelho sugere que a NA é libertada periféricamente, uma vez que a produção local de NA por células da córnea não explicaria essa disparidade de concentrações. Além do mais, esse gradiente não se verifica com a AD, sendo esta vestigial na córnea de Coelho. Estes primeiros resultados sugerem que a NA na córnea de Coelho será principalmente de origem neuronal, e que poderá existir uma maior densidade de terminais simpáticos na córnea periférica (Figueira et al., 2012a).

A possibilidade de outros tipos de células especializadas produzirem NA pode em certa medida limitar as interpretações supracitadas. Além disso, a simples detecção de aminas não implica que estas sejam efectivamente libertadas com o objectivo fisiológico de activação dos adrenoceptores da córnea. É ainda importante referir que este conjunto de resultados obtidos no Coelho pode não ser verificável no Homem.

A DA é produzida a partir da L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) pela acção da descarboxilase de aminoácidos aromáticos (Lovenberg et al., 1962) e é a primeira catecolamina a surgir nesta via sintética, possuindo já actividade biológica e sendo armazenada em terminais dopaminérgicos próprios. A DA tem dois destinos metabólicos principais: conversão a NA pela acção da dopamina-beta-hidroxilase ou oxidação a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) com perda consequente da actividade biológica, a que se segue metabolização adicional em diversos produtos catabólicos (Marsden, 2009). A NA é o principal neurotransmissor

produzido e libertado pelos nervos simpáticos e estes são, por conseguinte, considerados como sendo os principais reservatórios de NA no organismo (Adrian et al., 1932; Smith, 1973). Em alguns tecidos (por exemplo, a medula da glândula suprarrenal), a NA é ainda convertida em AD pela acção da feniletanolamina-N-metiltransferase e libertada na circulação sistémica, onde é principalmente responsável pelas acções endócrinas do sistema nervoso simpático (Ciaranello, 1978). Postas estas considerações, observemos o que resulta quando se calculam razões entre produtos finais enzimáticos e os seus substratos: a síntese activa de mediadores biogénicos é sugerida quando a razão é superior a 1, ou seja, o equilíbrio químico encontra-se desviado para o produto final; o inverso é verdadeiro para razões inferiores a 1. O cálculo das supracitadas razões pode assim permitir uma clarificação dos resultados, o que fizemos quando pretendemos determinar se a premissa da origem primordialmente neuronal de NA na córnea de Coelho seria extensível ao Homem.

Em geral, verificámos que os níveis de catecolaminas são cerca de uma unidade logarítmica mais baixos na córnea humana comparativamente à de Coelho (Figueira et al., 2018a), aspecto que está em concordância com dados disponíveis na literatura e que sugerem uma expressão mais modesta das vias simpáticas na córnea humana em comparação com a de outros animais (Ehinger, 1971; Müller et al., 2003; Toivanen et al., 1987).

Considerando os doseamentos das três catecolaminas (DA, NA e AD) nas córneas humanas e de Coelho, a DA revelou ser a mais abundante das catecolaminas nos segmentos centrais e intermédios, enquanto que nos segmentos periféricos a NA era dominante. Além disso, tal como descrito no Coelho, encontrámos um gradiente de concentração para a NA na córnea humana, com maiores concentrações de NA na periferia da córnea e menores concentrações no centro do tecido. Em boa verdade, é apenas nos segmentos periféricos que parece haver síntese activa de NA, conforme evidenciado por uma razão NA / DA superior a 1 (na realidade de 7.75 em humanos). Em contraste, tal gradiente não foi encontrado para a DA nem para a AD (esta vestigial na córnea de Coelho, conforme referido, e ausente na humana).

A DA apresenta maiores concentrações nos segmentos intermédio e central de ambas as espécies. Note-se que estes segmentos apresentam níveis mais elevados do metabolito DOPAC, enquanto que no segmento periférico os níveis baixos de DOPAC sugerem que a DA é sobretudo metabolizada em NA.

Uma razão AD / NA baixa em todos os segmentos corneanos revela que a síntese de AD não é um processo activo. Neste prisma, e tendo em mente a hipótese omnipresente de contaminação, a identificação de níveis baixos mas mensuráveis de AD na córnea de Coelho

poderia reflectir a expressão vestigial da enzima feniletanolamina-N-metiltransferase por alguns tipos celulares (Evinger, 1997), embora não fisiologicamente importante. Na córnea humana, tal mecanismo não parece sequer existir. Além disso, e tal como no Coelho, uma contribuição hipotética dos vasos sanguíneos límbicos como fonte de catecolaminas levaria à ocorrência de concentrações mais elevadas de AD na córnea periférica e um gradiente semelhante ao verificado para a NA, mas tal hipótese tem que ser claramente rejeitada à luz dos nossos dados. A existência de NA no humor aquoso não é igualmente uma explicação satisfatória para o gradiente de concentração de NA observado na córnea humana, pois tal como descrito no Coelho, a distribuição homogénea deste fluido na superfície corneana posterior não produziria qualquer gradiente. Por outro lado, a presença de catecolaminas nas lágrimas no Homem foi também descrita: quer a NA, quer a AD foram detectadas a esse nível, mas não a DA (Trope and Rumley, 1984). O filme lacrimal caracteriza-se por possuir maior amplitude na periferia, aspecto que pode ser ainda exacerbado em doenças da superfície ocular (Lakshmi Prabha, 2014). Contudo, tal não explicaria a acumulação periférica selectiva de NA, mas não de AD, nem a presença de DA tais como descritas nos nossos resultados, nem afectaria o carregamento de NA exógena radiomarcada ( $^3\text{H}$ -NA) e a sua subsequente redução pela cocaína (vide adiante). Globalmente, os nossos dados sugerem que a NA encontrada na córnea humana, tal como no Coelho, tem origem primordialmente em terminais nervosos (Figueira et al., 2018a).

A íris representa a parte mais anterior da úvea e é o tecido ocular cuja inervação simpática está melhor caracterizada, nomeadamente a responsabilidade desta na função do músculo dilatador da pupila e consequente resposta midriática (Kessler et al., 1983). Por conseguinte, a íris é um modelo adequado para avaliar a síntese, o armazenamento e a libertação de catecolaminas e, portanto, servir de marcador geral da actividade simpática em condições fisiológicas e experimentais. A este respeito, verificou-se ser a NA a amina mais abundante na tecido iridiano do Homem e do Coelho, cerca de três vezes mais do que a DA, não tendo sido detectada AD. As razões DA / DOPA de cerca de 2.5, DOPAC / DA de cerca de 0.75 e NA / DA de cerca de 3 sugerem uma produção activa de DA que é subsequentemente dirigida para a síntese de NA como a catecolamina final na íris de ambas as espécies, não ocorrendo síntese adicional de AD.

No humor aquoso, a concentração de DA é aproximadamente o dobro da de NA e não foi encontrada AD, tanto em seres humanos como em coelhos. A presença de catecolaminas no humor aquoso deve ser interpretada em termos da sua possível origem: o corpo ciliar

responsável pela secreção de humor aquoso (Cole, 1977, 1966; To et al., 2002) ou os nervos simpáticos localizados no estroma da íris e banhados pelo humor aquoso. Acreditamos que esta última hipótese se afigura como a mais provável, pois explica melhor a maior concentração das catecolaminas neuronais (DA e NA) encontradas no humor aquoso, para onde são provavelmente libertadas pelos nervos da íris (seja por exocitose ou difusão passiva), bem como a ausência de AD, a principal catecolamina plasmática, incapaz de atravessar a barreira hemato-ocular. O facto de os níveis de DA no humor aquoso serem superiores aos de NA, enquanto que na íris se verifica o contrário, relaciona-se provavelmente com a presença vestigial em forma solúvel de dopamina-beta-hidroxilase para a conversão DA-NA no humor aquoso (aspecto corroborado por uma baixa relação NA / DA de aproximadamente 0.5 em coelhos e humanos), uma vez que esta enzima está localizada dentro das vesículas nos terminais simpáticos e pode ser libertada por exocitose (Lamouroux et al., 1987; Weinshilboum and Axel, 1971).

O conjunto de resultados acima mencionado sugere que a córnea periférica parece actuar como um tecido produtor de NA, de modo semelhante à íris (mais precisamente os nervos simpáticos iridianos). Para tal facto, duas explicações são equacionáveis: 1) presença de nervos simpáticos localizados sobretudo na periferia da córnea, ou 2) mecanismos adrenérgicos intrínsecos da córnea. No momento presente desta discussão, ambas as explicações podem satisfazer adequadamente as evidências já apresentadas.

Uma vez que a nossa principal hipótese é a de que a NA responsável pela activação dos adrenoceptores corneanos é principalmente de origem neuronal, procuramos testar a sua veracidade estudando o efeito da cocaína na captação neuronal de NA tritiada radioactiva ( $^3\text{H}$ -NA) exógena. A base fisiológica para este ensaio resulta do facto de a captação neuronal ser o principal mecanismo responsável pela remoção da NA da biofase e, portanto, pela sua terminação de acção. Tal processo funciona tanto para catecolaminas endógenas (DA, NA, AD) como exógenas ( $^3\text{H}$ -NA) e, portanto, fornece um meio para sua quantificação. A cocaína é um potente inibidor da captação neuronal de catecolaminas por bloquear o transportador pré-sináptico e o carregamento subsequente com  $^3\text{H}$ -NA.

Em primeiro lugar, na ausência de cocaína, verificou-se ocorrer um gradiente no carregamento de  $^3\text{H}$ -NA, sendo este mais marcado na córnea periférica (quase 5 vezes maior do que nos segmentos corneanos centrais do Coelho; em humanos, só se verificou carregamento nos segmentos periféricos). As íris de ambas as espécies apresentaram as

concentrações mais elevadas de  $^3\text{H}$ -NA, aspecto já esperado tendo em vista a abundância de terminais nervosos simpáticos a esse nível.

Também verificámos que a incubação com cocaína resultou em diminuição acentuada do carregamento de  $^3\text{H}$ -NA no segmento periférico da córnea (sugerindo um gradiente) e na íris de ambas as espécies. No caso específico do Coelho, em que também ocorreu carga nos segmentos central e intermédio, verificou-se não ser esta sensível à cocaína, ou seja, o carregamento não é reduzido pela cocaína e, portanto, outros tipos celulares que não o tecido nervoso podem ter uma maior contribuição relativa para a concentração de NA nestes segmentos.

A redução no carregamento de  $^3\text{H}$ -NA após incubação com cocaína demonstra a presença de nervos simpáticos funcionais na córnea. O facto de tal fenómeno também se verificar na íris, conforme expectável, permitiu que este tecido funcionasse como um controlo na validação dos resultados observados na córnea. Dos factos supracitados resulta um crescente corpo de evidência relativo à origem neuronal principal da NA na córnea, embora não se possam excluir potenciais fontes não-neuronais e fisiologicamente menos relevantes (Figueira et al., 2018a).

Existe alguma controvérsia, nos mamíferos, relativamente à existência de diferenças significativas entre espécies na densidade da inervação simpática. Tal inervação foi caracterizada como densa (representando 10 a 15% da inervação corneana total) em córneas de Coelho (Laties and Jacobowitz, 1966; Marfurt et al., 1989; Morgan et al., 1987; Tervo and Palkama, 1978), mas em primatas (Homem incluído) as fibras corneanas simpáticas têm sido consideradas mais escassas (Ehinger, 1971; Ehinger and Sjöberg, 1971; Müller et al., 2003; Toivanen et al., 1987). Não obstante, e de acordo com os nossos resultados, verifica-se que os nervos simpáticos representam um contributo funcional na córnea que não deve ser subestimado, tal como evidenciado pela nossa comparação Homem-Coelho.

A idade e o género do indivíduo são considerados factores-chave que afectam a função dos nervos na córnea (Dvorscak and Marfurt, 2008; Müller et al., 2003), embora tal influência tenha sido melhor caracterizada para os nervos sensitivos e para o síndrome multifactorial do olho seco. Apesar de alguns autores terem sugerido que a densidade e orientação dos nervos corneanos não é directamente afectada pelas variáveis supracitadas (Erie et al., 2005; Hoşal et al., 2005), diversos trabalhos revelaram que a microscopia confocal *in vivo* da córnea

utilizada nessas observações poderá ter subestimado vários parâmetros morfológicos do plexo nervoso sub-basal quando comparada com técnicas de coloração imuno-histoquímica *ex vivo* (Kowtharapu et al., 2017). Mais recentemente, observações resultantes de microscopia confocal com análise realizada por *software* específico revelaram que a idade avançada, a presença de diabetes mellitus e de níveis mais elevados de hemoglobina glicosilada (HbA1c) se associam efectivamente a alterações significativas na morfologia do plexo nervoso sub-basal da córnea (Batawi et al., 2017).

Dados antropométricos e epidemiológicos, como a idade e o género, dos dadores das córneas utilizadas nos nossos trabalhos não nos foram infelizmente disponibilizados, uma vez que a Comissão de Ética limitou o acesso a informação específica dos dadores (o acesso a tais dados foi autorizado apenas para fins clínicos de transplantação e não para efeitos de investigação). Sabemos apenas que a rejeição das córneas humanas para transplante se ficou a dever a identificação *à posteriori* de serologias infecciosas positivas (Dubord et al., 2013), de que os exemplos mais frequentes no Banco de Olhos do Centro Hospitalar de S. João são as hepatites víricas, a infecção HIV e a sífilis, ou existência de adenocarcinoma metastizado. Não existe suporte bibliográfico que fundamente o impacto de tais condições na inervação da córnea e especificamente nos mecanismos adrenérgicos. Além disso, o tempo decorrido entre a morte e a colheita dos tecidos e posterior preservação também não nos foi revelado (apenas sabemos, por procedimento protocolar, que todas as colheitas foram efectuadas no período imediato de seis horas após o óbito), tendo tal facto impedido a ponderação de eventuais alterações *post-mortem* relacionadas com a degenerescência dos nervos da córnea e com a própria viabilidade do transportador simpático da NA. Não obstante, existe evidência diversa, obtida em protocolos experimentais distintos, relativa à viabilidade deste transportador e ao doseamento de catecolaminas em condições de perfusão tecidular (Haunsø and Buchanan, 2007; Mata et al., 2005; Sommerauer et al., 2012).

Para além da demonstração da origem neuronal da NA, a existência de um gradiente de carga e de um gradiente análogo de redução do carregamento por acção da cocaína sugere que os nervos simpáticos seguem um padrão topográfico diferente do dos nervos sensitivos (Marfurt et al., 2010), com uma maior densidade de terminais simpáticos na periferia da córnea (Figueira et al., 2018a).

Sendo uma regra cardinal em biologia o facto de uma estrutura geralmente se relacionar e evoluir com a função desempenhada, cedo se tornou premente o desenho de um estudo que



permitisse correlacionar aspectos funcionais com uma caracterização morfológica dos nervos simpáticos, de forma a clarificar a sua relação com os mecanismos intrínsecos simpáticos da córnea.

### Caracterização da regulação pré-juncional da libertação de noradrenalina na córnea, nomeadamente a presença e actividade dos adrenoceptores alfa-2 pré-sinápticos

Neste ponto, os nossos resultados permitiram adicionalmente clarificar a fisiologia da libertação da NA, determinar os seus mecanismos intrínsecos de regulação e conhecer a distribuição geral dos terminais simpáticos na córnea (Figueira et al., 2018b). Deste conhecimento pudemos subsequentemente derivar diversas implicações clínicas e patológicas.

Em primeiro lugar, algumas considerações devem ser tecidas relativamente à libertação espontânea de NA e à influência da estimulação eléctrica e do antagonismo dos adrenoceptores alfa-2, ou seja, à própria regulação pré-juncional da libertação de NA. Embora a libertação espontânea (ou efluxo basal) de  $^3\text{H}$ -NA na córnea tenha diminuído ao longo do tempo devido à diminuição progressiva da reserva de amina disponível, verificou-se que a quantidade de amina libertada por unidade de tempo (a taxa de perda fraccionada por minuto) não apresentava variação em condições basais (ou seja, sem estimulação) nas córneas humanas e de Coelho.

Em ambas as espécies, condições de estimulação similares demonstraram aumentar a taxa de perda fraccionada por minuto na mesma ordem de grandeza. Tais aumentos foram significativos, de cerca de 15% em córneas de Coelho e 9% em córneas humanas. A quantidade de  $^3\text{H}$ -NA libertada especificamente por estimulação eléctrica (após subtracção da quantidade libertada espontaneamente), expressa como proporção da quantidade de  $^3\text{H}$ -NA presente no tecido, foi aproximadamente a mesma em todos os períodos (S1 a S4). Este *overflow* de  $^3\text{H}$ -NA representa a libertação neuronal de NA induzida por um potencial de acção (Starke, 1977).

Curiosamente, detectou-se alguma variação na libertação de NA induzida por estimulação, sobretudo em córneas humanas, a qual se deverá provavelmente à interacção de mecanismos de *feedback* positivo e negativo na exocitose de NA e exercida por auto-receptores como os adrenoceptores alfa-2 e beta-2 (Trendelenburg et al., 2003). Esta hipótese é suportada pelo facto de a quantidade de  $^3\text{H}$ -NA libertada por cada choque eléctrico individual

(isto é, a taxa de perda fraccionada por choque) (Guimarães et al., 2004) ser a mesma. Este valor revelou também ser da mesma ordem de grandeza em córneas humanas e de Coelho ( $10^{-5}$  pmol / g por choque), sugerindo assim que os mecanismos adrenérgicos têm actividade biológica similar em ambas as espécies (Figueira et al., 2018b).

Trabalhos prévios revelaram que a tetrodotoxina 0.3 M (bloqueador de canais de sódio dependentes da voltagem), quando adicionada 15 minutos antes de um evento de estimulação eléctrica, permite abolir a resposta de *overflow* (Trendelenburg et al., 1997). O facto de não termos realizado tal experiência poderá constituir uma limitação ao nosso trabalho, na medida em que forneceria evidências adicionais a favor da libertação do neurotransmissor induzida por potencial de acção.

Em segundo lugar, a fim de estudar a influência dos auto-receptores neuronais pré-sinápticos, foi utilizado um antagonista dos adrenoceptores alfa-2, a rauvolscina. Descobrimos que a taxa de perda fraccionada por minuto de NA antes da estimulação eléctrica não é influenciada pela presença isolada de concentrações crescentes de rauvolscina – ou seja, a libertação espontânea de aminas não é afectada pelo bloqueio dos adrenoceptores alfa-2, possivelmente devido ao facto de as pequenas quantidades libertadas serem insuficientes para uma modulação pré-sináptica adequada (recorde-se que a captação neuronal e extraneuronal nas nossas experiências haviam sido bloqueadas pela cocaína e hidrocortisona, respectivamente) (Luchelli-Fortis MA, 1975; Starke, 1977). Por outras palavras, o antagonista por si só não tem efeito no efluxo basal de  $^3\text{H}$ -NA em córneas humanas e de Coelho.

Em condições de estimulação, a rauvolscina demonstrou potenciar o *overflow* de  $^3\text{H}$ -NA induzido por estimulação eléctrica e de forma dependente da concentração, até um máximo de 75% em coelhos e 64% em humanos na concentração de 100 nM (dado de elevado significado estatístico,  $P < 0.0001$ ). A nossa opção por pulsos eléctricos de duração relativamente longa (40 segundos) facilitou a demonstração do efeito auto-inibitório da libertação de  $^3\text{H}$ -NA mediado pelos adrenoceptores alfa-2 (Starke, 1977), facto evidenciado pela reversão desse efeito pelo antagonismo dos adrenoceptores alfa-2.

Este efeito da rauvolscina é notado mesmo ao nível da quantidade de  $^3\text{H}$ -NA libertada por choque eléctrico individual (a taxa de perda fracionada por choque), a qual também aumentou de maneira dependente da concentração até cerca de 542% em coelhos e 260% em

humanos, a 100 nM, embora apenas estatisticamente significativa em coelhos (possivelmente devido à menor amostra de córneas humanas). Além disso, deve-se acrescentar que alguma atenuação do efeito facilitador da libertação possa dever-se a efeitos adicionais hipotéticos do antagonismo dos adrenoreceptores alfa-2 (por exemplo, o bloqueio simultâneo de canais de cálcio nos terminais nervosos) ou à interacção com outros receptores pré-sinápticos (Trendelenburg et al., 1997). Salvo melhor informação, esta é a primeira demonstração funcional da libertação neuronal de NA por estimulação eléctrica na córnea e respectiva regulação pela interacção com auto-receptores pré-sinápticos alfa-2 (Figueira et al., 2018b).

Em terceiro lugar, a supracitada demonstração da regulação pré-juncional da libertação neuronal de NA pode esclarecer a ligação entre os mecanismos adrenérgicos e a homeostasia da córnea em situações fisiológicas e patológicas. O limbo córneo-escleral humano alberga uma população heterogénea de terminais nervosos em contacto íntimo com nichos de células estaminais localizados nas paliçadas de Vogt, facto que sugere a existência de potenciais contribuições neuronais para o micro-ambiente límbico (Al-Aqaba et al., 2017). Nesta linha de evidência, demonstrou-se por exemplo que os nervos sensitivos parecem ter um efeito inibitório sobre a neovascularização da córnea e, inversamente, os neovasos parecem inibir a regeneração dos terminais nervosos (Ferrari et al., 2013). Especificamente no caso da inervação simpática, têm sido propostas implicações na modulação do transporte de iões e da sensibilidade das fibras somáticas da córnea (Klyce et al., 1985; Kubilus and Linsenmayer, 2010). A este propósito, um modelo de dor neuropática associada ao nervo trigémeo sugeriu que a activação de adrenoreceptores alfa-2 pode inibir a transmissão nociceptiva (Shaheen et al., 2014; Takeda et al., 2002). Em nosso entender tal pode contribuir para explicar a conhecida toxicidade epitelial e aumento da espessura corneana central induzida por agonistas dos adrenoreceptores alfa-2, como a apraclonidina ou a brimonidina (Grueb et al., 2011; Shah et al., 2015), uma vez que estes fármacos inibem a libertação de NA na córnea. Citámos atrás, enquanto exemplo hipotético, um caso de queratite infecciosa rara por *E. meningoseptica* num doente com glaucoma medicado com brimonidina, entre outros hipotensores tópicos (Beato J., Figueira L. et al., 2016).

Como tal, propomos que a ligação a auto-receptores é o principal mecanismo intrínseco pelo qual a NA de origem neuronal regula a sua própria libertação e a de outros neurotransmissores, e possivelmente de peptídeos derivados de células residentes no limbo, todos participantes activos na homeostasia da córnea (Figueira et al., 2018b). Acrescente-se

que a disponibilidade de factores tróficos de origem neuronal é provavelmente de importância primordial em tecidos avasculares como a córnea.

A este propósito, vários estudos em humanos e outros mamíferos demonstraram que os nervos simpáticos libertam outros neuropeptídeos para além da NA, os quais podem estar envolvidos em processos de inflamação neurogénica da córnea e na remodelação do tecido após lesão (Cruzat et al., 2017; Gonzalez-Coto et al., 2014; Uusitalo et al., 1989). Em trabalhos envolvendo Ratos, a disfunção dos nervos simpáticos demonstrou ser um aspecto fundamental na fisiopatologia da queratite herpética. Num dos trabalhos, a simpatectomia química com 6-hidroxidopamina aumentou a susceptibilidade à reactivação da queratite por Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Os autores não observaram diferenças na infiltração de linfócitos T citotóxicos específicos para HSV-1 na córnea, mas descreveram um aumento nos níveis de substância P e uma diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  no gânglio trigeminal (Templeton et al., 2008). Noutro trabalho, descobriu-se que na córnea infectada por herpes os nervos sensitivos parecem ser substituídos num processo de hiper-inervação estromal por nervos simpáticos (com reactividade positiva à tirosina hidroxilase). A ganglionectomia cervical superior demonstrou evitar o supracitado processo de invasão simpática e prevenir o aparecimento de sequelas clínicas como os leucomas e a neovascularização corneana, ambos característicos da doença meta-herpética. A ganglionectomia pareceu também facilitar a reinervação pelos nervos sensitivos e a recuperação da sensibilidade da córnea (Yun et al., 2016). Acreditamos que os exemplos acima referidos ilustram adicionalmente o papel dos nervos simpáticos na resposta inflamatória e na reparação tecidular, enquanto participantes activos de um modelo global de inflamação neurogénica e de homeostasia na córnea. Deve ainda ser enfatizado que nesta discussão nos temos vindo a reportar aos efeitos da activação dos nervos simpáticos e não especificamente aos da NA, uma vez que diversos co-transmissores, entre os quais purinas como o ATP (Burnstock, 1995; Todorov et al., 1996), são libertados com a activação simpática.

Considerações adicionais podem ser enunciadas relativamente à relação entre o conteúdo de catecolaminas nas três secções lamelares da córnea (epitélio, estroma e endotélio) e os demais dados funcionais e morfológicos. No Homem e no Coelho, a NA predomina significativamente em toda a córnea (em boa verdade não encontramos AD na córnea humana e em coelhos os níveis de NA foram aproximadamente dez vezes superiores aos de AD), verificando-se a concentração mais elevada de NA no endotélio, seguido de perto pelo epitélio, e apenas com níveis mínimos no estroma. Em coelhos, a AD foi encontrada quase

exclusivamente no epitélio, estando tal facto de acordo com relatos anteriores (Pullar et al., 2007; Yasukura et al., 1995).

Conforme mencionado previamente, podemos inferir que há síntese activa de um interveniente metabólico quando a relação entre o produto final enzimático e o seu substracto é superior a 1, isto é, o equilíbrio químico encontra-se deslocado para o produto final; o inverso será verdadeiro para razões inferiores a 1, as quais sugerem uma queda na produção. Portanto, sendo a AD produzida a partir da NA, calculámos as razões AD / NA nos tecidos em estudo. Tais razões foram obviamente nulas em córneas humanas, pois não foi detectada AD, e nas córneas de Coelho foram muito inferiores a 1 em todas as secções lamelares (0.08 no máximo), do que podemos tirar uma de duas conclusões: 1) a síntese de AD não é um processo fisiologicamente activo, sendo os níveis mínimos de AD encontrados no epitélio um reflexo da expressão extra-adrenal vestigial de feniletanolamina-N-metiltransferase (Bohn et al., 1986; Krizanová et al., 2001); ou 2) simplesmente não ocorre síntese de AD na córnea (a AD detectada em córneas de Coelho pode na realidade ser captada a partir de tecidos ou vasos sanguíneos na proximidade). Tal interpretação está de acordo com os resultados descritos previamente, de que retirámos conclusões similares a partir do doseamento de catecolaminas em segmentos concêntricos da córnea (Figueira et al., 2018a).

Conforme referido, a secreção de NA e AD no filme lacrimal humano, descrita em trabalhos anteriores (Trope and Rumley, 1984) não explica o facto de que apenas uma catecolamina – a NA – seja detectada no epitélio corneano, pelo que as lágrimas não serão uma fonte provável de catecolaminas na córnea.

Tradicionalmente, tem sido assumido que a inervação simpática da córnea humana é de expressão modesta quando comparada à de outros animais, incluindo o Coelho (Ehinger, 1971; Laties and Jacobowitz, 1966; Toivanen et al., 1987). Os diversos estudos sobre este assunto basearam tais conclusões em métodos histofluorométricos para a identificação morfológica dos nervos simpáticos ao microscópio óptico, ou na medição do conteúdo de catecolaminas e outros co-transmissores expressos no tecido corneano.

Os nossos resultados revelam que, independentemente das diferenças nas concentrações de catecolaminas entre as córneas humanas e de Coelho (inferiores em cerca de uma unidade logarítmica na córnea humana), a quantidade de NA libertada (espontaneamente ou por estimulação eléctrica) é da mesma ordem de grandeza em ambas as espécies ( $10^{-2}$  pmol / g).

Devido ao facto de a densidade da inervação simpática num tecido poder ser inferida a partir da quantidade de NA libertada por estimulação nervosa (Potes et al., 2010), podemos, por conseguinte, propor que a inervação simpática apresenta relevância funcional semelhante em ambas as espécies, podendo as diferenças nas concentrações de catecolaminas na córnea ser atribuíveis a captação extra-neuronal (Figueira et al., 2018b). Acreditamos que esta importante contribuição autonómica para a inervação da córnea põe em evidência potenciais mecanismos fisiopatológicos na doença neurotrófica e na inflamação neurogénica, de que nos voltamos a reportar aos exemplos citados acima da queratite herpética e da toxicidade corneana dos agonistas alfa-2.

### Caracterização morfológica da inervação simpática na córnea e definição da sua relevância funcional

Em relação à imunofluorescência (Figueira et al., 2018b), a nossa opção pela marcação anti-PGP (*protein gene product 9.5*) é justificada pelo seu papel como biomarcador pan-neuronal (Marfurt et al., 1998), permitindo uma diferenciação mais fácil entre os nervos e os outros tipos celulares. Nervos somáticos e autonómicos foram desta forma identificados principalmente no estroma corneano anterior. A marcação adicional anti-CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) foi realizada porque este é um neuropeptídeo envolvido na sensação de dor (Mikulec and Tanelian, 1996) e, portanto, um marcador potencial de nervos sensitivos, muito embora a imunorreactividade dos nervos corneanos a este peptídeo tenha sido reportada como escassa em trabalhos prévios (Stone et al., 1986; Uusitalo et al., 1989). Nas nossas experiências, a marcação anti-CGRP permitiu identificar fibras sensitivas nos espaços intercelulares do epitélio e do estroma anterior.

A DBH (dopamina beta-hidroxilase) catalisa a síntese de NA a partir de DA encontrando-se localizada no interior das vesículas nos terminais simpáticos e ainda em alguns outros tecidos na forma solúvel (Lamouroux et al., 1987; Marsden, 2009; Potes et al., 2010; Weinshilboum and Axel, 1971), podendo servir assim como um marcador de mecanismos adrenérgicos, neuroniais ou não neuroniais. De acordo com os nossos resultados, as células epiteliais da córnea contém DBH, sugerindo tal facto que possam ter capacidade de síntese de NA. Da mesma forma, a presença de DBH no estroma anterior mais profundo pode sugerir a existência de queratócitos produtores de NA. Fibras simpáticas contendo DBH e PGP foram também identificadas no estroma anterior sub-epitelial, particularmente na periferia da córnea humana, com projecções para a camada basal do epitélio.

Para uma melhor diferenciação entre as células que expressam DBH, realizámos a marcação anti-TH (tirosina hidroxilase). Esta enzima catalisa a formação de L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) a partir da tirosina e é considerada um marcador de nervos simpáticos (Starke, 1977), tendo sido já localizada nos nervos da córnea. Estudos iniciais com microscopia de fluorescência, embora reconhecendo diferenças apreciáveis inter-espécies nos mamíferos, sugeriram no caso específico do Homem e demais primatas que os terminais adrenérgicos seriam mais numerosos na córnea no período embrionário, sendo mais escassos no adulto, em que se encontrariam principalmente dispostos num plexo perilábico (Ehinger, 1971, 1966; Laties and Jacobowitz, 1966). Tais dados foram corroborados por técnicas imuno-histoquímicas realizadas em olhos humanos e que descreveram nervos imunorreactivos para a TH principalmente no limbo, em associação com vasos sanguíneos ou penetrando radialmente no estroma da córnea, onde originavam plexos sub-epiteliais com alguns terminais livres intra-epiteliais (Marfurt and Ellis, 1993). Nos nossos dados relativos ao Homem e ao Coelho, a marcação anti-TH revelou uma maior expressão de fibras simpáticas (também DBH-positivas) no estroma corneano anterior e sobretudo periférico. Numa analogia com os nervos sensitivos, para os quais quanto maior é a profundidade à qual entram no estroma maior será a área posteriormente inervada, talvez os nervos simpáticos, porque penetrarem mais superficialmente no estroma, limitem a sua área de influência principal à periferia da córnea.

Considerando o facto de fibroblastos activados poderem também revelar expressão de PGP, algo descrito em feridas cutâneas no Homem (Olerud et al., 1998), procurámos um marcador adicional capaz de distinguir os queratócitos estromais das fibras nervosas. Neste sentido, a vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários sendo considerada um marcador fiável de fibroblastos (Agocha and Eghbali-Webb, 1997) e, no caso da córnea, dos queratócitos (Scott et al., 2011), facto que demonstra a sua origem mesenquimatosa e permite a sua distinção do tecido neuronal (Ivaska et al., 2007). Embora as células epiteliais da córnea, à semelhança de outros epitélios, tenham demonstrado expressar filamentos intermediários de vimentina durante a maturação celular e reparação tecidular (Kasper et al., 1992; SundarRaj et al., 1992), não verificámos, todavia, imunorreactividade nas células epiteliais no decurso das nossas experiências. Em ambas as espécies, a marcação da membrana de Descemet foi intensa (mas sem marcação das células endoteliais), tendo a vimentina sido também encontrada em queratócitos espalhados pelo estroma, particularmente no Homem. A discreta co-localização com a DBH sugere que os queratócitos, embora podendo expressar esta enzima, não desempenham provavelmente um papel

relevante nos mecanismos adrenérgicos. Todavia, podemos supor a existência de interações entre estas células e os nervos simpáticos, uma vez que têm a capacidade de produzir factor de crescimento neuronal (*nerve growth factor*, NGF) (Shaheen et al., 2014), enquanto que por seu lado os nervos simpáticos podem influenciar a migração e reparação celulares, conforme citado acima. Nesta óptica, a relação de interdependência entre os nervos da córnea, tanto somáticos como autonómicos, e os demais tipos celulares poderá ser capital para explicar o vínculo entre a sensibilidade e a integridade do tecido corneano.

À luz dos nossos resultados no estudo de efeitos pré-juncionais (Figueira et al., 2018b), procurámos definir a localização dos adrenoceptores alfa-2 na córnea humana. A sua posição pré-sináptica preferencial como auto-receptores (Gyires et al., 2009; Starke, 1977) permite-lhes servir como marcadores adicionais de terminais simpáticos pós-ganglionares. Estes nervos foram assim identificados principalmente nos espaços intercelulares da camada basal do epitélio (em co-localização com PGP) e particularmente no estroma anterior e sobretudo periférico. O facto de o anticorpo primário por nós utilizado ser dirigido contra o subtipo alfa-2a destes adrenoceptores poderá constituir uma limitação relevante a uma caracterização exacta, uma vez que outros trabalhos sugeriram que os subtipos alfa-2b e 2c também podem constituir populações pré-sinápticas relevantes, apesar de não se reportarem especificamente ao tecido corneano (Civantos-Calzada, De-Artiñano, 2001; Gyires et al., 2009).

As elevadas concentrações de NA encontradas no endotélio sugerem que esta amina é provavelmente captada pelas células endoteliais a partir do humor aquoso, para onde é libertada pelos nervos simpáticos da íris, um mecanismo proposto em olhos humanos e de Coelho (Figueira et al., 2018a). Além disso, não foram descritos níveis de AD no humor aquoso, e, em concordância, não encontrámos AD no endotélio. O facto de as células endoteliais não possuírem as enzimas TH e DBH fornece evidência adicional de que o seu conteúdo em NA seja derivado do humor aquoso. A ausência de CGRP, PGP e adrenoceptores alfa-2 sugere ainda a ausência absoluta de nervos, somáticos ou autonómicos, no estroma posterior da córnea e no endotélio. Em nosso entender, a via de regulação AMP cíclico–PKA proposta a nível das células endoteliais (Grueb et al., 2008) e que explica a associação entre desnervação simpática e descompensação endotelial com edema corneano (Zamir et al., 1999), dependerá da noradrenalina libertada no humor aquoso e assim indirectamente dos nervos simpáticos iridianos.



A nível epitelial, a maior parte da NA detectada tem origem provavelmente em terminais simpáticos na camada basal do epitélio e no estroma anterior sub-epitelial, com maior expressão na córnea periférica, podendo todavia haver contribuição menor das células epiteliais (que provavelmente sequestram NA de origem neuronal, embora não se possa descartar a ocorrência de alguma síntese).

Deve ser realçado que, devido à elevada fiabilidade da instrumentação e técnicas cirúrgicas de dissecação lamelar da córnea, não foi realizado nenhum controlo histológico das amostras a fim de confirmar que apenas células epiteliais, estroma ou células endoteliais e membrana de Descemet estariam presentes em cada secção lamelar (Figueira et al., 2018b). Podendo tal aspecto influenciar a correcta determinação de catecolaminas nas secções lamelares da córnea, é nossa convicção de que foi de escassa relevância dado as grandes diferenças encontradas, e a sucessiva reprodutibilidade amostral, nas concentrações lamelares de catecolaminas.

Outras limitações devem ser apontadas ao nosso trabalho. Conforme mencionado por outros autores (Batawi et al., 2017; He et al., 2010), variáveis como a idade avançada, existência de diabetes mellitus e níveis mais elevados de hemoglobina glicosilada (HbA1c) podem afectar significativamente a morfologia e densidade do plexo nervoso sub-basal da córnea, se bem que tais alterações estejam menos caracterizadas no caso específico das fibras simpáticas. Além disso, e conforme referido acima, eventuais alterações *post-mortem* na topografia e fisiologia nervosas não puderam ser consideradas, uma vez em que o tempo decorrido entre a morte e a colheita das córneas, provavelmente heterogéneo, não estava disponível nos dados autorizados pela Comissão de Ética. Apesar de tais omissões, pudemos controlar factores locais na medida em que apenas córneas de aspecto macroscópico normal foram seleccionadas para este trabalho (Figueira et al., 2018a, 2018b).

### Estabelecimento da importância relativa das contribuições do sistema nervoso simpático e dos mecanismos adrenérgicos locais na córnea

Relativamente à contribuição relativa da inervação simpática e dos mecanismos adrenérgicos locais, parece-nos que a primeira se assume em pleno como a via fisiológica mais importante para a origem de NA na córnea. Reproduziremos abaixo os fundamentos mais relevantes, e previamente discutidos, que suportam esta afirmação.

Demonstrámos que os níveis de catecolaminas são inferiores em cerca de uma unidade logarítmica na córnea humana comparativamente à córnea de Coelho, mas em ambas as espécies existe um gradiente análogo de concentração de NA decrescendo da periferia da córnea para o centro, algo que não se verifica para a DA nem para a AD. A redução do carregamento de NA após incubação com cocaína demonstra a presença de nervos simpáticos funcionais, e os supracitados gradientes sugerem que a densidade de fibras simpáticas é maior na córnea periférica. Tal distribuição é compatível com uma origem neuronal principal da NA (Figueira et al., 2018a).

Demonstrámos também a ocorrência de libertação neuronal de NA por estimulação eléctrica na córnea e a sua regulação por autorreceptores alfa-2 pré-sinápticos: a ocorrência de um *overflow* de NA induzido por estimulação eléctrica reflecte a libertação do neurotransmissor associada ao potencial de acção dos nervos simpáticos; a adição de um antagonista dos adrenoceptores alfa-2, ao mesmo tempo que não produziu efeito no efluxo basal de NA, aumentou o *overflow* electricamente induzido de NA de modo dependente da concentração, sugerindo a existência de um mecanismo modulado por adrenoceptores alfa-2 para a libertação neuronal de NA na córnea (Figueira et al., 2018b).

Demonstrámos que a inervação simpática tem relevância funcional semelhante em córneas humanas e de Coelho, facto inferido pela quantidade de NA radioactiva libertada por estimulação nervosa (da mesma ordem de grandeza em ambas as espécies), sugerindo a manutenção filogenética de um mecanismo neuronal adrenérgico com implicações na fisiologia da córnea.

Demonstrámos que as fibras simpáticas estão localizadas principalmente no estroma anterior, com maior expressão na córnea periférica, de onde se estendem até a camada basal do epitélio. O facto adicional de a NA predominar significativamente em relação à AD na córnea, particularmente no endotélio (sequestrada do humor aquoso para onde é libertada pelos nervos simpáticos da íris) e no epitélio (para onde é libertada pelos nervos simpáticos da córnea, com alguma captação por células epiteliais, não descartando alguma capacidade hipoteticamente de síntese de catecolaminas) fornece suporte adicional à relevância primordial da origem neuronal da NA. Por seu lado, a AD não parece encontrar-se na córnea do Homem, e na córnea de Coelho os níveis vestigiais dever-se-ão provavelmente a captação a partir de vasos sanguíneos e tecidos adjacentes (Figueira et al., 2018b).

Um esclarecimento cabal do papel da inervação simpática e dos mecanismos adrenérgicos em geral na córnea humana saudável e doente obrigará ao desenho e condução de estudos adicionais. O papel específico dos nervos simpáticos na inflamação neurogénica e na queratopatia neurotrófica não foi ainda totalmente elucidado no Homem.



## VI. CONCLUSÕES

A discussão produzida acerca da presente investigação permite-nos apresentar as seguintes conclusões:

Do ponto de vista clínico, identificámos a importância dos factores de risco na etiopatogénese da queratite infecciosa, com destaque para o trauma, o uso de lentes de contacto e a diabetes mellitus. Observámos que todos podem originar lesão aguda ou crónica dos nervos da superfície ocular, predispondo à infecção da córnea. Situações específicas de queratite podem ocorrer associadas à aplicação crónica de agonistas adrenérgicos alfa-2, que diminuem a libertação pré-sináptica de NA, ou a queratopatia bolhosa no contexto de disfunção endotelial, potenciada pelo compromisso da inervação simpática ocular. O caso concreto da diabetes associa-se ao desenvolvimento de queratopatia neurotrófica secundária a neuropatia somática e autonómica. Verificámos ainda que a doença herpética prévia, enquanto causa infecciosa de queratopatia neurotrófica, atrasa a reparação corneana e aumenta a probabilidade de sequelas visuais.

Relativamente ao conteúdo em catecolaminas na córnea do Homem e do Coelho, revelámos que a DA é a catecolamina mais abundante em localização central e intermédia, enquanto que à periferia a NA é dominante. A tal acresce ser a NA mais abundante do que a AD em toda a córnea (sendo que na córnea humana não se encontrou AD). Existe efectivamente um gradiente de concentração de NA diminuindo da periferia para o centro da córnea em ambas as espécies, não se verificando tal com a AD. No plasma de ambas as espécies a AD é predominante. Tais premissas sugerem que a córnea, sobretudo na sua região periférica, parece actuar como um tecido produtor de NA (e em que a DA funciona essencialmente como um precursor de NA), levantando-se uma de duas possibilidades essenciais: 1) a NA é libertada por nervos simpáticos, ou 2) a NA é produzida por células não-neuronais.

A conclusão de que a NA corneana é principalmente de origem neuronal é apoiada pelo facto de que a incubação com cocaína resultou numa diminuição acentuada no carregamento de  $^3\text{H}$ -NA no segmento periférico da córnea e na íris em comparação com controlos na ausência de cocaína. Esta redução no carregamento de  $^3\text{H}$ -NA após incubação com cocaína, para além de demonstrar a presença de nervos simpáticos na córnea, sugere que a NA se encontra armazenada sobretudo em tecido neuronal. A ocorrência do mesmo fenómeno na íris, tecido

com inervação simpática abundante e que funcionou assim como controlo, permitiu validar os resultados verificados da córnea.

Tomando a córnea nas suas secções lamelares, a NA é particularmente abundante no endotélio e no epitélio. O endotélio não apresenta capacidade de síntese de NA pelo que esta será captada a partir do humor aquoso, para onde é secretada pelos nervos simpáticos localizados na íris. Pusemos em evidência que a origem principal da NA, tendo em vista a sua distribuição, será nos nervos simpáticos da córnea; admite-se todavia que alguma NA seja captada pelas células epiteliais. A síntese de AD no epitélio da córnea de Coelho parece não ser fisiologicamente relevante e esta amina provavelmente é captada do sangue ou de tecidos adjacentes. Alguns queratócitos estromais em ambas as espécies parecem expressar a enzima DBH, mas considerando os níveis vestigiais de NA detectados no estroma corneano, concluímos que aquelas células provavelmente não desempenham um papel importante nos mecanismos adrenérgicos.

A identificação adicional de um gradiente no carregamento de  $^3\text{H}$ -NA similar ao da NA endógena, e a verificação, após incubação com cocaína, de uma redução gradativa no carregamento de  $^3\text{H}$ -NA com particular expressão na periferia da córnea sugere implicações morfológicas: os nervos simpáticos da córnea estarão dispostos de forma topograficamente distinta da dos nervos sensitivos, com maior densidade de terminações simpáticas na córnea periférica. A este propósito, os estudos de imunofluorescência confirmaram a presença de fibras simpáticas (DBH e TH positivas) no estroma anterior, principalmente na periferia da córnea, estendendo-se à camada basal do epitélio. Conforme referido, o facto de os nervos simpáticos penetrarem mais superficialmente no estroma corneano talvez restrinja a sua área de inervação principal à córnea periférica.

Do ponto de vista fisiológico, a ocorrência de um *overflow* de NA induzido por estimulação eléctrica demonstrou a libertação deste neurotransmissor associada ao potencial de acção dos nervos simpáticos. A adição de rauvolscina, antagonista dos adrenoreceptores alfa-2, embora não produzindo efeito no efluxo basal de NA, aumentou o *overflow* associado a estimulação eléctrica e de modo dependente da concentração, demonstrando, à semelhança de outros tecidos, a existência na córnea de modulação pré-sináptica da libertação neuronal de NA mediada por adrenoreceptores alfa-2.

Independentemente das diferenças nas concentrações de catecolaminas, conclui-se assim que a inervação simpática tem relevância funcional similar na córnea do Homem e do Coelho, uma vez que a densidade nervosa e respectiva actividade podem ser inferidas a partir da quantidade de NA libertada por estimulação, e esta revelou ser da mesma ordem de grandeza em ambas as espécies.

Equacionando um modelo global dos mecanismos adrenérgicos representados na córnea, podemos afirmar que a noradrenalina envolvida nos processos fisiológicos e fisiopatológicos deste tecido tem origem primordialmente neuronal: essa origem é representada pelos nervos simpáticos corneanos no caso das células epiteliais, e pelos nervos simpáticos iridianos no caso das células endoteliais.

Este conjunto de resultados experimentais permitiu-nos definir uma via reguladora para a libertação neuronal de NA na córnea e estabelecer a sua relevância funcional enquanto principal contribuição para as vias adrenérgicas corneanas em detrimento da produção local ou da difusão hematogénea de catecolaminas. Por outro lado, permitiu-nos clarificar ainda aspectos adicionais relacionados com a topografia dos nervos simpáticos, correlacionando a estrutura com a função, e sugerimos algumas implicações clínicas através da identificação de factores de risco para lesão neuronal e infecção da córnea.





## VII. REFERÊNCIAS

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Acosta, M.C., Alfaro, M.L., Borrás, F., Belmonte, C., Gallar, J., 2006. Influence of age, gender and iris color on mechanical and chemical sensitivity of the cornea and conjunctiva. *Exp. Eye Res.* 83, 932–938. doi:10.1016/j.exer.2006.04.018
- Acosta, M.C., Berenguer-Ruiz, L., Garcia-Galvez, A., Perea-Tortosa, D., Gallar, J., Belmonte, C., 2005. Changes in mechanical, chemical, and thermal sensitivity of the cornea after topical application of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 282–286. doi:10.1167/iovs.04-0884
- Acosta, M.C., Luna, C., Graff, G., Meseguer, V.M., Viana, F., Gallar, J., Belmonte, C., 2007. Comparative effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nepafenac on corneal sensory nerve fibers responding to chemical irritation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 182–188. doi:10.1167/iovs.06-0710
- Acosta, M.C., Tan, M.E., Belmonte, C., Gallar, J., 2001. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2063–2067. doi:10.1016/S0002-9394(01)01279-X
- Adrian, D., Bronk, D.W., Phillips, G., Adrian, E.D., 1932. Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J. Physiol.* 74, 115–133. doi:10.1113/jphysiol.1932.sp002832
- Agocha, A.E., Eghbali-Webb, M., 1997. A simple method for preparation of cultured cardiac fibroblasts from adult human ventricular tissue. *Mol. Cell. Biochem.* 172, 195–198. doi:10.1023/A:1006848512174
- Al-Aqaba, M.A., Anis, F.S., Mohammed, I., Dua, H.S., 2017. Nerve terminals at the human corneoscleral limbus. *Br. J. Ophthalmol.* *bjophthalmol-2017-311146*. doi:10.1136/bjophthalmol-2017-311146
- Alexandrakis, G., Alfonso, E.C., Miller, D., 2000. Shifting trends in bacterial keratitis in South Florida and emerging resistance to fluoroquinolones. *Ophthalmology* 107, 1497–1502. doi:10.1016/S0161-6420(00)00179-2
- Alvarado, J., Murphy, C., Juster, R., 1983. Age-related changes in the basement membrane of the human corneal epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 1015–1028.
- Armitage, W.J., Dick, A.D., Bourne, W.M., 2003. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3326. doi:10.1167/iovs.02-

- Atchison, D.A., 2017. Optics of the Human Eye, in: Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.09773-3
- Batawi, H., Shalabi, N., Joag, M., Koru-Sengul, T., Rodriguez, J., Green, P.T., Campigotto, M., Karp, C.L., Galor, A., 2017. Sub-basal Corneal Nerve Plexus Analysis Using a New Software Technology. *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 0, 1. doi:10.1097/ICL.0000000000000375
- Baum, J.L., 1979. Initial therapy of suspected microbial corneal ulcers. I. Broad antibiotic therapy based on prevalence of organisms. *Surv. Ophthalmol.* 24, 97–105. doi:10.1016/0039-6257(79)90127-9
- Beato, J., Espinar, M., Figueira, L., Eremina, Y., Ribeiro, M., Moreira, R., Falcão-Reis, F., 2016. Elizabethkingia meningoseptica and Contact Lens Use. *Acta Med. Port.* 29, 287. doi:10.20344/amp.7048
- Bee, J.A., 1982. The development and pattern of innervation of the avian cornea. *Dev. Biol.* 92, 5–15. doi:10.1016/0012-1606(82)90145-2
- Bee, J.A., Hay, R.A., Lamb, E.M., Devore, J.J., Conrad, G.W., 1986. Positional specificity of corneal nerves during development. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27, 38–43.
- Belmonte, C., 2007. Eye dryness sensations after refractive surgery: impaired tear secretion or “phantom” cornea? *J. Refract. Surg.* 23, 598–602.
- Belmonte, C., Acosta, M.C., Gallar, J., 2004a. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp. Eye Res.* doi:10.1016/j.exer.2003.09.023
- Belmonte, C., Aracil, A., Acosta, M.C., Luna, C., Gallar, J., 2004b. Nerves and sensations from the eye surface. *Ocul. Surf.* 2, 248–253. doi:10.1016/S1542-0124(12)70112-X
- Beuerman, R.W., Rózsa, A.J., 1984. Collateral sprouts are replaced by regenerating neurites in the wounded corneal epithelium. *Neurosci. Lett.* 44, 99–104. doi:10.1016/0304-3940(84)90228-3
- Beuerman, R.W., Schimmelpfennig, B., 1980. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp. Neurol.* 69, 196–201. doi:10.1016/0014-4886(80)90154-5
- Beuerman, R.W., Tanelian, D.L., 1979. Corneal pain evoked by thermal stimulation. *Pain* 7, 1–14. doi:10.1016/0304-3959(79)90102-7
- Black, J.A., Waxman, S.G., 2002. Molecular identities of two tetrodotoxin-resistant sodium channels in corneal axons. *Exp. Eye Res.* 75, 193–199. doi:10.1006/exer.2002.2014
- Boettner, E.A., Wolter, J.R., 1962. Transmission of the Ocular Media. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1, 776–783. doi:10.1017/S0025315406014421

- Bohn, M.C., Goldstein, M., Black, I.B., 1986. Expression and development of phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) in rat brain stem: Studies with glucocorticoids. *Dev. Biol.* 114, 180–193. doi:10.1016/0012-1606(86)90394-5
- Bonini, S., Rama, P., Olzi, D., Lambiase, A., 2003. Neurotrophic keratitis. *Eye*. doi:10.1038/sj.eye.6700616
- Boulton, M., Albon, J., Grant, M.B., 2013. Stem Cells in the Eye, in: *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*. pp. 1399–1412. doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00066-5
- Bourcier, T., Acosta, M.C., Borderie, V., Borrás, F., Gallar, J., Bury, T., Laroche, L., Belmonte, C., 2005. Decreased corneal sensitivity in patients with dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2341–5. doi:10.1167/iovs.04-1426
- Bourcier, T., Thomas, F., Borderie, V., Chaumeil, C., Laroche, L., 2003. Bacterial keratitis: Predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br. J. Ophthalmol.* 87, 834–838. doi:10.1136/bjo.87.7.834
- Bruce, A.S., Brennan, N.A., 1990. Corneal pathophysiology with contact lens wear. *Surv. Ophthalmol.* doi:10.1016/0039-6257(90)90046-X
- Burnstock, G., 1995. Noradrenaline and ATP: Cotransmitters and neuromodulators. *J. Physiol. Pharmacol.* doi:10.1016/0197-0186(90)90158-P
- Ceyhan, M., Yildirim, I., Tekeli, A., Yurdakok, M., Us, E., Altun, B., Kutluk, T., Cengiz, A.B., Gurbuz, V., Barin, C., Bagdat, A., Cetinkaya, D., Gur, D., Tuncel, O., 2008. A *Chryseobacterium meningosepticum* outbreak observed in 3 clusters involving both neonatal and non-neonatal pediatric patients. *Am. J. Infect. Control* 36, 453–457. doi:10.1016/j.ajic.2007.09.008
- Chan, K.Y., Jarvelainen, M., Chang, J.H., Edenfield, M.J., 1990. A cryodamage model for studying corneal nerve regeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 2008–2021.
- Chen, X., Gallar, J., Belmonte, C., 1997. Reduction by antiinflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1944–1953. doi:10.1016/S0002-9394(99)80127-5
- Ciaranello, R.D., 1978. Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase. *Biochem. Pharmacol.* 27, 1895–1897. doi:10.1016/0006-2952(78)90002-3
- Civan, M.M., Macknight, A.D.C., 2004. The ins and outs of aqueous humour secretion. *Exp. Eye Res.* doi:10.1016/j.exer.2003.09.021
- Civantos Calzada, B., Aleixandre De Artiñano, A., 2001. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.* doi:10.1006/phrs.2001.0857
- Cole, D.F., 1977. Secretion of the aqueous humour. *Exp. Eye Res.* 25, 161–176. doi:10.1016/S0014-4835(77)80015-8

- Cole, D.F., 1966. Aqueous humour formation. *Doc. Ophthalmol.* 21, 116–238.  
doi:10.1007/BF00184135
- Collier, S.A., Gronostaj, M.P., MacGurn, A.K., Cope, J.R., Awsumb, K.L., Yoder, J.S., Beach, M.J., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014. Estimated burden of keratitis--United States, 2010. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 63, 1027–30.  
doi:mm6345a3 [pii]
- Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G., Sun, T.T., Lavker, R.M., 1989. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57, 201–209. doi:10.1016/0092-8674(89)90958-6
- Cruzat, A., Pavan-Langston, D., Hamrah, P., 2011. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves: Analysis and Clinical Correlation. *Semin Ophthalmol.* 25, 171–177.  
doi:10.3109/08820538.2010.518133.In
- Cruzat, A., Qazi, Y., Hamrah, P., 2017. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves in Health and Disease. *Ocul. Surf.* 15, 15–47. doi:10.1016/j.jtos.2016.09.004
- D., D. Pietro, F., G., F., T., E., N.-O., 2011. Polyneuropathy and psoriasis: A retrospective study on 275 polyneuropathic patients. *J. Peripher. Nerv. Syst.*
- Daxer, A., Misof, K., Grabner, B., Ettl, A., Fratzl, P., 1998. Collagen fibrils in the human corneal stroma: Structure and aging. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 644–648.
- De Felipe, C., Belmonte, C., 1999. c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *Eur. J. Neurosci.* 11, 899–906.  
doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00498.x
- De Felipe, C., Gonzalez, G.G., Gallar, J., Belmonte, C., 1999. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: Effect of corneal wounding. *Eur. J. Pain* 3, 31–39. doi:10.1016/S1090-3801(99)90186-6
- Dejaco-Ruhswurm, I., Scholz, U., Hanselmayer, G., Skorpik, C., 2001. Contact lens induced keratitis associated with contact lens wear. *Acta Ophthalmol. Scand.* 79, 479–483.  
doi:10.1034/j.1600-0420.2001.790510.x
- Diogenes, A., Akopian, A.N., Hargreaves, K.M., 2007. NGF Up-regulates TRPA1: Implications for orofacial pain. *J. Dent. Res.* 86, 550–555.  
doi:10.1177/154405910708600612
- Doughty, M.J., Laiquzzaman, M., Müller, A., Oblak, E., Button, N.F., 2002. Central corneal thickness in European (white) individuals, especially children and the elderly, and assessment of its possible importance in clinical measures of intra-ocular pressure.

- Ophthalmic Physiol. Opt. 22, 491–504. doi:10.1046/j.1475-1313.2002.00053.x
- Doughty, M.J., Zaman, M.L., 2000. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: A review and meta-analysis approach. *Surv. Ophthalmol.* doi:10.1016/S0039-6257(00)00110-7
- Du, Y., Funderburgh, M.L., Mann, M.M., SundarRaj, N., Funderburgh, J.L., 2005. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 23, 1266–75. doi:10.1634/stemcells.2004-0256
- Du, Y., Sundarraj, N., Funderburgh, M., Harvey, S., Birk, D., Funderburgh, J., 2007. Secretion and organization of a cornea-like tissue in vitro by stem cells from human corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5038–5045.
- Dubord, P.J., Evans, G.D., MacSai, M.S., Mannis, M.J., Glasser, D.B., Strong, D.M., Noël, L., Fehily, D., 2013. Eye banking and corneal transplantation communicable adverse incidents: Current status and project NOTIFY. *Cornea* 32, 1155–1166. doi:10.1097/ICO.0b013e31828f9d64
- Dvorscak, L., Marfurt, C.F., 2008. Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 910–916. doi:10.1167/iovs.07-1324
- Edelhauser, H.F., 2000. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery, in: *Cornea*. pp. 263–273. doi:10.1097/00003226-200005000-00002
- Ehinger, B., 1971. A comparative study of the adrenergic nerves to the anterior eye segment of some primates. *Zeitschrift fur Zellforsch. und mikroskopische Anat.* 116, 157–177. doi:10.1007/BF00331259
- Ehinger, B., 1966. Connections between Adrenergic Nerves and other Tissue Components in the Eye. *Acta Physiol. Scand.* 67, 57–64. doi:10.1111/j.1748-1716.1966.tb03287.x
- Ehinger, B., Sjöberg, N.O., 1971. Development of the ocular adrenergic nerve supply in man and guinea-pig. *Zeitschrift fur Zellforsch. und mikroskopische Anat.* 118, 579–592. doi:10.1007/BF00324622
- Erie, J.C., McLaren, J.W., Hodge, D.O., Bourne, W.M., 2005. The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea* 24, 705–709. doi:10.1097/01.ico.0000154387.51355.39
- Evinger, M.J., 1997. Determinants of Phenylethanolamine-N-methyltransferase Expression. *Adv. Pharmacol.* 42, 73–76. doi:10.1016/S1054-3589(08)60699-7
- Faragher, R.G.A., Mulholland, B., Tuft, S.J., Sandeman, S., Khaw, P.T., 1997. Aging and the cornea. *Br. J. Ophthalmol.* doi:10.1136/bjo.81.10.814
- Fatouros, I., Chatzinikolaou, A., Paltoglou, G., Petridou, A., Avloniti, A., Jamurtas, A., Goussetis, E., Mitrakou, A., Mougios, V., Lazaropoulou, C., Margeli, A., Papassotiriou,

- I., Mastorakos, G., 2010. Acute resistance exercise results in catecholaminergic rather than hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation during exercise in young men. *Stress* 13, 461–468. doi:10.3109/10253891003743432
- Ferrari, G., Hajrasouliha, A.R., Sadrai, Z., Ueno, H., Chauhan, S.K., Dana, R., 2013. Nerves and neovessels inhibit each other in the cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 813–820. doi:10.1167/iovs.11-8379
- Ferreira, C.S., Figueira, L., Moreira-Gonçalves, N., Moreira, R., Torrão, L., Falcão-Reis, F., 2016. Clinical and Microbiological Profile of Bacterial Microbial Keratitis in a Portuguese Tertiary Referral Center—Where Are We in 2015? *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 00, 1. doi:10.1097/ICL.0000000000000298
- Figueira, L., Ferreira, C., Janeiro, C., Serrao, P., Falcão-Reis, F., Moura, D., 2018a. Concentration gradient of noradrenaline from the periphery to the centre of the cornea - A clue to its origin. *Exp. Eye Res.* doi:10.1016/j.exer.2018.01.008
- Figueira, L., Janeiro, C., Ferreira, F., Serrao, P., Perestrelo, S., 2018b. Regulation of corneal noradrenaline release and topography of sympathetic innervation: Functional implications for adrenergic mechanisms in the human cornea. *Exp. Eye Res.* 121–132. doi:10.1016/j.exer.2018.05.023
- Figueira, L., Matos, J., Serrao, P., Falcão-Reis, F., Moura, D., 2012a. Concentration gradient of endogenous noradrenaline from periphery to centre in the rabbit cornea. *Acta Ophthalmol.* 90, 1–6. doi:10.1111/j.1755-3768.2012.2233.x/full
- Figueira, L., Pinheiro, D., Moreira, R., Pinto, E., Simões, J., Camisa, E., Torrão, L., Palmares, J., Falcão-Reis, F., 2012b. *Beauveria bassiana* keratitis in bullous keratopathy: Antifungal sensitivity testing and management. *Eur. J. Ophthalmol.* 22, 814–818. doi:10.5301/ejo.5000152
- Foster, S., Azar, D.T., Dohlman, C.H., 2005. Smolin and Thoft's *The Cornea: Scientific Foundations and Clinical Practice*, in: 4th Edition. p. Chapter 47 Corneal Endothelial Dystrophies. doi:10.1056/nejm200512083532324
- Fountain, T.R., 2008. *Albert & Jakobiec's Principles & Practice of Ophthalmology*, Albert & Jakobiec's *Principles & Practice of Ophthalmology*. doi:10.1016/B978-1-4160-0016-7.50415-X
- Gallar, J., Acosta, M.C., Gutiérrez, A.R., Belmonte, C., 2007. Impulse activity in corneal sensory nerve fibers after photorefractive keratectomy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4033–4037. doi:10.1167/iovs.07-0012
- Galor, A., Covington, D., Levitt, A.E., McManus, K.T., Seiden, B., Felix, E.R., Kalangara, J., Feuer, W., Patin, D.J., Martin, E.R., Sarantopoulos, K.D., Levitt, R.C., 2016.

- Neuropathic ocular pain due to dry eye is associated with multiple comorbid chronic pain syndromes. *J. Pain* 17. doi:10.1016/j.jpain.2015.10.019
- Galor, A., Levitt, R.C., Felix, E.R., Martin, E.R., Sarantopoulos, C.D., 2015. Neuropathic ocular pain: an important yet underevaluated feature of dry eye. *Eye* 29. doi:10.1038/eye.2014.263
- Garcia-Hirschfeld, J., Lopez-Briones, L.G., Belmonte, C., 1994. Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 59, 597–605. doi:10.1006/exer.1994.1145
- Ghoghawala, S.Y., Mannis, M.J., Pullar, C.E., Rosenblatt, M.I., Isseroff, R., 2008.  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Signaling Mediates Corneal Epithelial Wound Repair 49, 1857–1863. doi:10.1167/iovs.07-0925.
- Gillette, T.E., Chandler, J.W., Greiner, J. V, 1982. Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology* 89, 700–711. doi:10.1016/S0161-6420(82)34737-5
- Gipson, I., Joyce, N., 2008. Anatomy and cell biology of the cornea, superficial limbus, and conjunctiva, in: Albert DM, Jakobiec FA, Eds, *Principles and Practice of Ophthalmology*, 3rd Ed. Philadelphia, PA, Saunders. pp. 423–420.
- Gonzalez-Coto, A.F., Alonso-Ron, C., Alcalde, I., Gallar, J., Meana, Á., Merayo-Llodes, J., Belmonte, C., 2014. Expression of cholecystokinin, gastrin, and their receptors in the mouse cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 1965–1975. doi:10.1167/iovs.13-12068
- Gordon, R.A., Donzis, P.B., 1985. Refractive Development of the Human Eye. *Arch. Ophthalmol.* 103, 785–789. doi:10.1001/archophth.1985.01050060045020
- Gottlieb, A.B., Chao, C., Dann, F., 2008. Psoriasis comorbidities. *J. Dermatolog. Treat.* doi:10.1080/09546630701364768
- Grueb, M., Bartz-Schmidt, K.U., Rohrbach, J.M., 2008. Adrenergic regulation of cAMP/protein kinase A pathway in corneal epithelium and endothelium. *Ophthalmic Res.* 40, 322–328. doi:10.1159/000150446
- Grueb, M., Mielke, J., Rohrbach, J.M., Schlote, T., 2011. Effect of brimonidine on corneal thickness. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 27, 503–509. doi:10.1089/jop.2010.0198
- Guimarães, S., Carneiro, C., Brandão, F., Pinheiro, H., Albino-Teixeira, A., Moura, D., 2004. A pharmacological differentiation between postjunctional (AT1A) and prejunctional (AT1B) angiotensin II receptors in the rabbit aorta. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370, 262–269. doi:10.1007/s00210-004-0977-7
- Gürçan, Ş., Tuğrul, H.M., Yörük, Y., Özer, B., Tatman-Otkun, M., Otkun, M., 2006. First case report of empyema caused by *Beauveria bassiana*. *Mycoses* 49, 246–248. doi:10.1111/j.1439-0507.2006.01232.x

- Gyires, K., Zádori, Z.S., Török, T., Mátyus, P., 2009.  $\alpha(2)$ -Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem. Int.* 55, 447–53. doi:10.1016/j.neuint.2009.05.014
- Hamrah, P., Liu, Y., Zhang, Q., Dana, M.R., 2003. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 581–589. doi:10.1167/iovs.02-0838
- Handwerker, H.O., 1991. Electrophysiological mechanisms in inflammatory pain. *Agents Actions Suppl* 32, 91–99.
- Hanna, C., O'Brien, J.E., 1960. Cell Production and Migration in the Epithelial Layer of the Cornea. *Arch. Ophthalmol.* 64, 536–539. doi:10.1001/archopht.1960.01840010538009
- Harris, L.W., Purves, D., 1989. Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living mice. *J. Neurosci.* 9, 2210–4.
- Haunsø, A., Buchanan, D., 2007. Pharmacological characterization of a fluorescent uptake assay for the noradrenaline transporter. *J. Biomol. Screen.* 12, 378–384. doi:10.1177/1087057107299524
- Hayashi, K., Hayashi, H., Hayashi, F., 1995. Topographic analysis of the changes in corneal shape due to aging. *Cornea* 14, 527–32.
- He, J., Bazan, N.G., Bazan, H.E.P., 2010. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* 91, 513–523. doi:10.1016/j.exer.2010.07.007
- Henke, M.O., De Hoog, G.S., Gross, U., Zimmermann, G., Kraemer, D., Weig, M., 2002. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2698–2702. doi:10.1128/JCM.40.7.2698-2702.2002
- Ho, J.D., Tsai, C.Y., Tsai, R.J.F., Kuo, L.L., Tsai, I.L., Liou, S.W., 2008. Validity of the keratometric index: Evaluation by the Pentacam rotating Scheimpflug camera. *J. Cataract Refract. Surg.* 34, 137–145. doi:10.1016/j.jcrs.2007.09.033
- Hogan, M.J., Alvarado, J.A., Wedell, J.E., 1971. *Histology of the Human Eye*, Philadelphia, WB Saunders.
- Hoque, S.N., Graham, J., Kaufmann, M.E., Tabaqchali, S., 2001. *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 47, 188–192. doi:10.1053/jhin.2000.0908
- Hoşal, B.M., Ornek, N., Zilelioğlu, G., Elhan, a H., 2005. 20. Morphology of corneal nerves and corneal sensation in dry eye: a preliminary study. *Eye (Lond).* 19, 1276–1279. doi:10.1038/sj.eye.6701760
- Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., Kinoshita, S., 2000. Growth



- factors: Importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* 19, 113–129. doi:10.1016/S1350-9462(99)00007-5
- Ivaska, J., Pallari, H.M., Nevo, J., Eriksson, J.E., 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.040
- Jester, J. V., 2008. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2007.09.015
- Jones, D.B., 1979. Initial therapy of suspected microbial corneal ulcers. II. Specific antibiotic therapy based on corneal smears. *Surv Ophthalmol* 24, 97,105-116.
- Jones, M.A., Marfurt, C.F., 1996. Sympathetic stimulation of corneal epithelial proliferation in wounded and nonwounded rat eyes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2535–2547.
- Kasper, M., Stosiek, P., Lane, B., 1992. Cytokeratin and vimentin heterogeneity in human cornea. *Acta Histochem.* 93, 371–381. doi:10.1016/S0065-1281(11)80106-6
- Keay, L., Edwards, K., Naduvilath, T., Taylor, H.R., Snibson, G.R., Forde, K., Stapleton, F., 2006. Microbial keratitis: Predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology.* doi:10.1016/j.ophtha.2005.08.013
- Kessler, J.A., Bell, W.O., Black, I.B., 1983. Interactions between the sympathetic and sensory innervation of the iris. *J Neurosci* 3, 1301–1307.
- Kirby, M.L., Diab, I.M., Mattio, T.G., 1978. Development of adrenergic innervation of the iris and fluorescent ganglion cells in the choroid of the chick eye. *Anat. Rec.* 191, 311–319. doi:10.1002/ar.1091910304
- Kjesbu, S.S., Moksnes, K., Klepstad, P., Knobel, H., Kaasa, S., Dale, O., 2005. [Application of pupillometry and pupillary reactions in medical research]. *Tidsskr. Den Nor. Lægeforening Tidsskr. Prakt. Med. Ny Række* 125, 29–32.
- Klyce, S.D., Beuerman, R.W., Crosson, C.E., 1985. Alteration of corneal epithelial ion transport by sympathectomy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26, 434–442.
- Kohlhaas, M., 1998. Corneal sensation after cataract and refractive surgery. *J. Cataract Refract. Surg.* doi:10.1016/S0886-3350(98)80237-X
- Koike, H., Sobue, G., 2013. Paraneoplastic neuropathy. *Handb. Clin. Neurol.* 115, 713–726. doi:10.1016/B978-0-444-52902-2.00041-2
- Kowtharapu, B.S., Winter, K., Marfurt, C., Allgeier, S., Köhler, B., Hovakimyan, M., Stahnke, T., Wree, A., Stachs, O., Guthoff, R.F., 2017. Comparative quantitative assessment of the human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo confocal microscopy and histological staining. *Eye* 31, 481–490. doi:10.1038/eye.2016.220
- Krizanová, O., Micutková, L., Jeloková, J., Filipenko, M., Sabban, E., Kvetnanský, R., 2001. Existence of cardiac PNMT mRNA in adult rats: elevation by stress in a glucocorticoid-

- dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1372-9.
- Kruse, F.E., Tseng, S.C., 1993. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 1963–76.
- Kubilus, J.K., Linsenmayer, T.F., 2010. Developmental corneal innervation: Interactions between nerves and specialized apical corneal epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 782–789. doi:10.1167/iov.09-3942
- Lakshmi Prabha, J., 2014. Tear secretion - A short review. *J. Pharm. Sci. Res.* 6, 155–157.
- Lam, D.S.C., Houang, E., Fan, D.S.P., Lyon, D., Seal, D., Wong, E., 2002. Incidence and risk factors for microbial keratitis in Hong Kong: comparison with Europe and North America. *Eye (Lond)*. 16, 608–618. doi:10.1038/sj.eye.6700151
- Lambiase, A., Manni, L., Bonini, S., Rama, P., Micera, A., Aloe, L., 2000. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1063–1069.
- Lamoureux, a, Vigny, a, Faucon Biguet, N., Darmon, M.C., Franck, R., Henry, J.P., Mallet, J., 1987. The primary structure of human dopamine-beta-hydroxylase: insights into the relationship between the soluble and the membrane-bound forms of the enzyme. *EMBO J.* 6, 3931–3937.
- Lass, J.H., Sugar, A., Benetz, B.A., Beck, R.W., Dontchev, M., Gal, R.L., Kollman, C., Gross, R., Heck, E., Holland, E.J., Mannis, M.J., Raber, I., Stark, W., Stulting, R.D., 2010. Endothelial cell density to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* 128, 63–9. doi:10.1001/archophthalmol.2010.128.63
- Laties, A.M., Jacobowitz, D., 1966. A Comparative Study of the Autonomic Innervation of the Eye in Monkey, Cat, and Rabbit. *Anat. Rec.* 383–395.
- Lavker, R.M., Tseng, S.C.G., Sun, T.-T., 2004. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp. Eye Res.* 78, 433–446. doi:10.1016/j.exer.2003.09.008
- LeBlanc, J., 1976. THE ROLE OF CATECHOLAMINES IN ADAPTATION TO CHRONIC AND ACUTE STRESS, in: *Catecholamines and Stress*. pp. 409–417. doi:10.1016/B978-0-08-020588-5.50058-8
- Leiper, L.J., Ou, J., Walczysko, P., Kucerova, R., Lavery, D.N., West, J.D., Collinson, J.M., 2009. Control of patterns of corneal innervation by Pax6. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 1122–1128. doi:10.1167/iov.08-2812
- Lerman, S., 1984. Biophysical aspects of corneal and lenticular transparency. *Curr. Eye Res.* 3, 3–14. doi:10.3109/02713688408997182

- Lichtinger, A., Yeung, S.N., Kim, P., Amiran, M.D., Iovieno, A., Elbaz, U., Ku, J.Y.F., Wolff, R., Rootman, D.S., Slomovic, A.R., 2012. Shifting trends in bacterial keratitis in Toronto: An 11-year review. *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2012.03.031
- Liesegang, T.J., 1999. Varicella-zoster virus eye disease. *Cornea* 18, 511–531. doi:10.1097/00003226-199909000-00002
- Lindstrom, R.L., Kaufman, H.E., Skelnik, D.L., Laing, R.A., Lass, J.H., Musch, D.C., Trousdale, D., Reinhart, W.J., Burris, T.E., Sugar, A., Davis, R.M., Hirokawa, K., Smith, T., Gordon, J.F., 1992. Optisol Corneal Storage Medium. *Am. J. Ophthalmol.* 114, 345–356. doi:10.1016/S0002-9394(14)71803-3
- Liu, G.S., Trope, G.E., Basu, P.K., 1990. Beta adrenoceptors and regenerating corneal epithelium. *J Ocul Pharmacol* 6, 101–112. doi:10.1089/jop.1990.6.101
- Lovenberg, W., Weissbach, H., Udenfriend, S., 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 237, 89–93.
- Luchelli-Fortis MA, L.S., 1975. Selective inhibition by hydrocortisone of 3H-normetanephrine formation during 3H-transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 275.
- Luchs, J.L., Cohen, E.J., Rapuano, C.J., Laibson, P.R., 1997. Ulcerative keratitis in bullous keratopathy. *Ophthalmology* 104, 816–822. doi:10.1016/S0161-6420(97)30228-0
- Lwigale, P.Y., Bronner-Fraser, M., 2007. Lens-derived Semaphorin3A regulates sensory innervation of the cornea. *Dev. Biol.* 306, 750–759. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.012
- Malik, N.S., Moss, S.J., Ahmed, N., Furth, A.J., Wall, R.S., Meek, K.M., 1992. Ageing of the human corneal stroma: structural and biochemical changes. *Biochim. Biophys. Acta* 1138, 222–8. doi:10.1016/0925-4439(92)90041-k
- Marfurt, C.F., Cox, J., Deek, S., Dvorscak, L., 2010. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp. Eye Res.* 90, 478–492. doi:10.1016/j.exer.2009.12.010
- Marfurt, C.F., Ellis, L.C., 1993. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *J. Comp. Neurol.* 336, 517–531. doi:10.1002/cne.903360405
- Marfurt, C.F., Jones, M.A., Thrasher, K., 1998. Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Exp. Eye Res.* 66, 437–448. doi:10.1006/exer.1997.0445
- Marfurt, C.F., Kingsley, R.E., Echtenkamp, S.E., 1989. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 461–472.
- Marsden, C.A., 2009. Dopamine: the rewarding years. *Br. J. Pharmacol.* 147, S136–S144. doi:10.1038/sj.bjp.0706473

- Mata, S., Urbina, M., Manzano, E., Ortiz, T., Lima, L., 2005. Noradrenaline transporter and its turnover rate are decreased in blood lymphocytes of patients with major depression. *J. Neuroimmunol.* 170, 134–140. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.08.007
- Matzner, O., Devor, M., 1994. Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol* 72, 349–359. doi:10.1152/jn.1994.72.1.349
- Maurice, D.M., 1957. The structure and transparency of the cornea. *J. Physiol.* 136, 263–286. doi:10.1113/jphysiol.1957.sp005758
- McGowan, S.L., Edelhauser, H.F., Pfister, R.R., Whitehart, D.R., 2007. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol. Vis.* 13, 1984–2000. doi:v13/a224 [pii]
- Meek, K.M., Leonard, D.W., Connon, C.J., Dennis, S., Khan, S., 2003. Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye.* doi:10.1038/sj.eye.6700574
- Mikulec, A.A., Tanelian, D.L., 1996. CGRP increases the rate of corneal re-epithelialization in an in vitro whole mount preparation. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 12, 417–423.
- Millodot, M., 1977. The influence of age on the sensitivity of the cornea,. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 240–242.
- Mishima, H., Yasumoto, K., Nishida, T., Otori, T., 1987. Fibronectin enhances the phagocytic activity of cultured rabbit keratocytes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 1521–1526.
- Mohan, R.R., Hutcheon, A.E.K., Choi, R., Hong, J.W., Lee, J.S., Mohan, R.R., Ambrósio, R., Zieske, J.D., Wilson, S.E., 2003. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp. Eye Res.* 76, 71–87. doi:10.1016/S0014-4835(02)00251-8
- Møller-Pedersen, T., 2004. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp. Eye Res.* 78, 553–560. doi:10.1016/S0014-4835(03)00208-2
- Møller-Pedersen, T., 1997. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea* 16, 333–8.
- Møller-Pedersen, T., Ledet, T., Ehlers, N., 1994. The keratocyte density of human donor corneas. *Curr. Eye Res.* 13, 163–169. doi:10.3109/02713689409042412
- Morgan, C., DeGroat, W.C., Jannetta, P.J., 1987. Sympathetic innervation of the cornea from the superior cervical ganglion. An HRP study in the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20, 179–183.
- Müller, L.J., Marfurt, C.F., Kruse, F., Tervo, T.M.T., 2003. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* 76, 521–542. doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2
- Müller, L.J., Pels, L., Vrensen, G.F., 1996. Ultrastructural organization of human corneal

- nerves. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 476–488.
- Muller, L.J., Pels, L., Vrensen, G.F.J.M., 1995. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 2557–2567.
- Nagasaki, T., Zhao, J., 2003. Centripetal movement of corneal epithelial cells in the normal adult mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 558–566. doi:10.1167/iov.02-0705
- Ng, A.L.-K., To, K.K.-W., Choi, C.C.-L., Yuen, L.H., Yim, S.-M., Chan, K.S.-K., Lai, J.S.-M., Wong, I.Y.-H., 2015. Predisposing Factors, Microbial Characteristics, and Clinical Outcome of Microbial Keratitis in a Tertiary Centre in Hong Kong: A 10-Year Experience. *J. Ophthalmol.* 2015, 1–9. doi:10.1155/2015/769436
- Niederer, R.L., Perumal, D., Sherwin, T., McGhee, C.N.J., 2007. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 1165–9. doi:10.1136/bjo.2006.112656
- Olerud, J.E., Chiu, D.S., Usui, M.L., Gibran, N.S., Ansel, J.C., 1998. Protein gene product 9.5 is Expressed by fibroblasts in human cutaneous wounds. *J. Invest. Dermatol.* 111, 565–572. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00330.x
- Patel, D. V., McGhee, C.N.J., 2009. In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: A review. *Br. J. Ophthalmol.* doi:10.1136/bjo.2008.150615
- Patel, D. V., Sherwin, T., McGhee, C.N.J., 2006. Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2823–2827. doi:10.1167/iov.05-1492
- Pavesio, C.E., Meier, F.M., 2001. Systemic disorders associated with episcleritis and scleritis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* doi:10.1097/00055735-200112000-00013
- Piatigorsky, J., 2001. Enigma of the abundant water-soluble cytoplasmic proteins of the cornea: The “refracton” hypothesis. *Cornea* 20, 853–858. doi:10.1097/00003226-200111000-00015
- Potes, C.S., Turek, V.F., Cole, R.L., Vu, C., Roland, B.L., Roth, J.D., Riediger, T., Lutz, T. a, 2010. Noradrenergic neurons of the area postrema mediate amylin’s hypophagic action. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R623–R631. doi:10.1152/ajpregu.00791.2009
- Pullar, C.E., Zhao, M., Song, B., Pu, J., Reid, B., Ghoghawala, S., McCaig, C., Isseroff, R.R., 2007. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J. Cell. Physiol.* 211, 261–272. doi:10.1002/jcp.20934

- Ray, K.J., Prajna, L., Srinivasan, M., Geetha, M., Karpagam, R., Glidden, D., Oldenburg, C.E., Sun, C.Q., McLeod, S.D., Acharya, N.R., Lietman, T.M., 2013. Fluoroquinolone treatment and susceptibility of isolates from bacterial keratitis. *JAMA Ophthalmol.* 131, 310–313. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1718
- Riley, N.C., Lwigale, P.Y., Conrad, G.W., 2001. Specificity of corneal nerve positions during embryogenesis. *Mol. Vis.* 7, 297–304. doi:v7/a42 [pii]
- Rivera, L., Gallar, J., Pozo, M. a, Belmonte, C., 2000. Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. *J. Physiol.* 527 Pt 2, 305–313. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00305.x
- Rozsa, A.J., Guss, R.B., Beuerman, R.W., 1983. Neural remodelling following experimental surgery of the rabbit cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 1033–1051.
- Sacchetti, M., Lambiase, A., 2014. Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clin. Ophthalmol.* doi:10.2147/OPTH.S45921
- Sasaoka, A., Ishimoto, I., Kuwayama, Y., Sakiyama, T., Manabe, R., Shiosaka, S., Inagaki, S., Tohyama, M., 1984. Overall distribution of substance P nerves in the rat cornea and their three-dimensional profiles. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 351–356.
- Schaefer, F., Bruttin, O., Zografos, L., Guex-Crosier, Y., 2001. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol* 85, 842–847.
- Schermer, A., Galvin, S., Sun, T.T., 1986. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 103, 49–62. doi:10.1083/jcb.103.1.49
- Scott, S.G., Jun, A.S., Chakravarti, S., 2011. Sphere formation from corneal keratocytes and phenotype specific markers. *Exp. Eye Res.* 93, 898–905. doi:10.1016/j.exer.2011.10.004
- Shah, A.A., Modi, Y., Thomas, B., Wellik, S.R., Galor, A., 2015. Brimonidine allergy presenting as vernal-like keratoconjunctivitis. *J. Glaucoma* 24, 89–91. doi:10.1097/IJG.0b013e3182953aef
- Shaheen, B.S., Bakir, M., Jain, S., 2014. Corneal nerves in health and disease. *Surv. Ophthalmol.* 59, 263–285. doi:10.1016/j.survophthal.2013.09.002
- Smith, A.D., 1973. Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves. *Br. Med. Bull.* 29, 123–129. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a070981
- Sommerauer, C., Rebernik, P., Reither, H., Nanoff, C., Pifl, C., 2012. The noradrenaline transporter as site of action for the anti-Parkinson drug amantadine. *Neuropharmacology* 62, 1708–1716. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.11.017
- Stachs, O., Zhivov, A., Kraak, R., Stave, J., Guthoff, R., 2007. In vivo three-dimensional

- confocal laser scanning microscopy of the epithelial nerve structure in the human cornea. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 569–575. doi:10.1007/s00417-006-0387-2
- Starke, K., 1977. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 77, 1–124.
- Stein, R., Stein, H.A., Cheskes, A., Symons, S., 1994. Photorefractive keratectomy and postoperative pain. *Am. J. Ophthalmol.* 117, 403–405. doi:10.1016/S0002-9394(14)73155-1
- Steinhoff, M., Schaubert, J., Leyden, J.J., 2013. New insights into rosacea pathophysiology: A review of recent findings. *J. Am. Acad. Dermatol.* 69. doi:10.1016/j.jaad.2013.04.045
- Stone, R.A., Kuwayama, Y., Terenghi, G., Polak, J.M., 1986. Calcitonin gene-related peptide: Occurrence in corneal sensory nerves. *Exp. Eye Res.* doi:10.1016/S0014-4835(86)80097-5
- SundarRaj, N., Rizzo, J.D., Anderson, S.C., Gesiotto, J.P., 1992. Expression of vimentin by rabbit corneal epithelial cells during wound repair. *Cell Tissue Res.* 267, 347–56.
- Takeda, M., Ikeda, M., Tanimoto, T., Lipski, J., Matsumoto, S., 2002. Changes of the excitability of rat trigeminal root ganglion neurons evoked by  $\alpha_2$ -adrenoreceptors. *Neuroscience* 115, 731–741. doi:10.1016/S0306-4522(02)00481-5
- Tanelian, D.L., Barry, M.A., Johnston, S.A., Le, T., Smith, G.M., 1997. Semaphorin III can repulse and inhibit adult sensory afferents in vivo. *Nat. Med.* 3, 1398–1401. doi:10.1038/nm1297-1398
- Taylor, L., Menconi, M., Leibowitz, H.M., Polgar, P., 1982. The effect of ascorbate, hydroperoxides, and bradykinin on prostaglandin production by corneal and lens cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23, 378–382.
- Templeton, A., Nguyen, G., Ash, J.D., Straub, R.H., Carr, D.J.J., 2008. Chemical Sympathectomy Increases Susceptibility to Ocular Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J Neuroimmunol.* 197, 37–46. doi:10.1016/j.humov.2008.02.015.Changes
- Tervo, T., Moilanen, J., 2003. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog. Retin. Eye Res.* doi:10.1016/S1350-9462(02)00064-2
- Tervo, T., Palkama, A., 1978. Innervation of the rabbit cornea. A histochemical and electron-microscopic study. *Acta Anat. (Basel).* 102, 164–175.
- To, C.H., Kong, C.W., Chan, C.Y., Shahidullah, M., Do, C.W., 2002. The mechanism of aqueous humour formation. *Clin. Exp. Optom.* doi:10.1111/j.1444-0938.2002.tb02384.x
- Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Craviso, G.L., Bjur, R.A., Westfall, D.P., 1996.

- Evidence for the differential release of the cotransmitters ATP and noradrenaline from sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 496, 731–748.  
doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021723
- Toivanen, M., Tervo, T., Parranen, M., Vannas, A., Hervonen, A., 1987. Histochemical Demonstration of Adrenergic Nerves in the Stroma of Human Cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 398–400.
- Trendelenburg, A. U., Sutej, I., Wahl, C. a, Molderings, G.J., Rump, L.C., Starke, K., 1997. A re-investigation of questionable subclassifications of presynaptic  $\alpha_2$ -autoreceptors: rat vena cava, rat atria, human kidney and guinea-pig urethra. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356, 721–37.
- Trendelenburg, A.U., Philipp, M., Meyer, A., Klebroff, W., Hein, L., Starke, K., 2003. All three  $\alpha_2$ -adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 368, 504–512. doi:10.1007/s00210-003-0829-x
- Trendelenburg, A.U., Sutej, I., Starke, K., 1997. Presynaptic  $\alpha_2A/D$ -autoreceptors in the brain cortex of *Cercopithecus aethiops*. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355, 341–346.
- Trope, G.E., Rumley, A.G., 1984. Catecholamine concentrations in tears. *Exp. Eye Res.* 39, 247–250. doi:10.1016/0014-4835(84)90012-5
- Tucker, D.L., Beresford, C.H., Sigler, L., Rogers, K., 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5412–5414. doi:10.1128/JCM.42.11.5412-5414.2004
- Uusitalo, H., Krootila, K., Palkama, A., 1989. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive sensory nerves in the human and guinea pig uvea and cornea. *Exp. Eye Res.* 48, 467–475. doi:10.1016/0014-4835(89)90030-4
- Vinik, A.I., Nevoret, M.-L., Casellini, C., Parson, H., 2013. Diabetic neuropathy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 42, 747–87. doi:10.1016/j.ecl.2013.06.001
- Walkenbach, R.J., Ye, G.S., Reinach, P.S., Boney, F., 1991.  $\alpha_1$ -Adrenoceptors in Human Corneal Epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 3067–3072.
- Watsky, M.A., 1995. Keratocyte gap junctional communication in normal and wounded rabbit corneas and human corneas. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 2568–2576.
- Waxman, S.G., Dib-Hajj, S., Cummins, T.R., Black, J.A., 1999. Sodium channels and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7635–7639. doi:10.1073/pnas.96.14.7635
- Weil-Malherbe, H., Axelrod, J., Tomchick, R., 1959. Blood-Brain Barrier for Adrenaline. *Source Sci. New Ser.* 129, 1226–1227. doi:10.1126/science.129.3357.1226



- Weinshilboum, R., Axel, J., 1971. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ. Res.* 28, 307–315. doi:10.1161/01.RES.28.3.307
- Whikehart, D.R., Parikh, C.H., Vaughn, A. V, Mishler, K., Edelhauser, H.F., 2005. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol. Vis.* 11, 816–824.
- Winn, B., Whitaker, D., Elliott, D.B., Phillips, N.J., 1994. Factors affecting light-adapted pupil size in normal human subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 1132–1137.
- Woost, P.G., Brightwell, J., Eiferman, R.A., Schultz, G.S., 1985. Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. *Exp Eye Res* 40, 47–60.
- Yasukura, T., Inoue, M., Irie, T., Hara, M., Mikami, Y., Zeng, X.T., Mikami, T., Omori, K., Minato, A., Uyama, M., ., 1995. Adrenergic receptor-mediated Cl<sup>-</sup> transport in rabbit corneal endothelial cells. *Jpn.J Pharmacol.* 67, 315–320.
- Yee, R.W., Matsuda, M., Schultz, R.O., Edelhauser, H.F., 1985. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr. Eye Res.* 4, 671–678. doi:10.3109/02713688509017661
- You, L., Kruse, F.E., Volcker, H.E., 2000. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 692–702.
- Yu, C.Q., Rosenblatt, M.I., 2007. Transgenic corneal neurofluorescence in mice: A new model for in vivo investigation of nerve structure and regeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 1535–1542. doi:10.1167/iov.06-1192
- Yun, H., Lathrop, K.L., Hendricks, R.L., 2016. A central role for sympathetic nerves in herpes stromal keratitis in mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 1749–1756. doi:10.1167/iov.16-19183
- Zamir, E., Chowers, I., Banin, E., Frucht-Pery, J., 1999. Neurotrophic corneal endothelial failure complicating acute Horner syndrome. *Ophthalmology* 106, 1692–1696. doi:10.1016/S0161-6420(99)90362-7
- Zander, E., Weddell, G., 1951. Observations on the innervation of the cornea. *J. Anat.* 85, 68–99.
- Zhang, C., Liang, Y., Deng, S., Wang, Z., Li, R., Sun, X., 2008. Distribution of bacterial keratitis and emerging resistance to antibiotics in China from 2001 to 2004. *Clin Ophthalmol* 2, 575–579.

